

Université de Montréal

Cellules souches, hormones sexuelles et régénération thymique

par

Maude Dumont-Lagacé

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Biologie Moléculaire, option générale

Août, 2018

© Maude Dumont-Lagacé, 2018

Résumé

Le thymus subit une dégénérescence précoce, appelée involution thymique, qui mène à une perte de fonction graduelle de la production de cellules T naïves avec l'âge. Certains ont stipulé que l'involution thymique, comme cause première de l'immunosénescence, pourrait être à l'origine de l'incidence croissante des maladies infectieuses et des cancers avec l'âge. Malgré cette dégénérescence avec l'âge, le thymus possède une grande capacité régénérative chez les jeunes adultes. En effet, le thymus retrouve une taille et une fonction normales dans les semaines suivant une involution aiguë causée par différents stress (infection, irradiations, etc.). De plus, le thymus est grandement influencé par les hormones sexuelles. Alors que l'ablation des hormones sexuelles mène à une hypertrophie du thymus, l'injection d'hormones stéroïdiennes ou l'augmentation des taux d'hormones survenant naturellement pendant la puberté ou la grossesse provoquent une involution thymique.

Nous avons donc cherché à comprendre quels étaient les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant la fonction thymique chez l'adulte, afin de comprendre quels facteurs sont importants dans la régénération thymique. La régulation de la production de cellules T étant orchestrée par le stroma thymique, nous avons concentré nos études sur les cellules épithéliales thymiques (TEC), principales composantes du stroma thymique. Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre l'impact des hormones sexuelles mâles et femelles sur les TEC chez l'adulte. Nous avons trouvé que les androgènes affectaient particulièrement les TEC corticales (cTEC), menant à une sous-expression de gènes essentiels à la thymopoïèse et à une diminution de leur prolifération. Nous avons ensuite cherché à identifier les cellules souches de l'épithélium thymique chez l'adulte, responsables de la maintenance et de la régénération du thymus. Nous avons identifié dans les cTEC une sous-population cellulaire quiescente et résistante aux

radiations, qui prolifère activement pendant la phase régénérative suivant une involution aiguë. Enfin, nous avons étudié les différentes populations cellulaires du thymus après la grossesse, dans le but d'identifier les facteurs essentiels à la régénération thymique postpartum. Étonnamment, malgré une diminution de 70% de la masse du thymus, aucune perte de cellules dans l'épithélium thymique ne survient pendant la gestation. De plus, le déclenchement de la régénération thymique postpartum ne nécessite pas l'expansion cellulaire de l'épithélium thymique, mais implique plutôt d'importants changements phénotypiques chez les cTEC. En effet, suite à l'accouchement, les cTEC surexpriment *Foxn1* et ces cibles, dont plusieurs sont essentielles à la thymopoïèse. Enfin, nos résultats suggèrent que *Klf4* pourrait agir comme modulateur de la croissance thymique, entre autres par l'inhibition de *Foxn1*, à titre d'effecteur de la signalisation hormonale. Globalement, nos travaux ont mis en lumière l'importance des cTEC dans la régulation de la régénération thymique, en plus d'identifier *Klf4* comme potentiel régulateur de la fonction thymique.

Mots-clés : Thymus, Régénération, Cellules souches, Hormones sexuelles, Cellules épithéliales thymiques, Développement, Involution thymique

Abstract

The thymus undergoes an early deterioration of its function with age, leading to a gradual decrease of the production of naïve T cells. This thymic involution is thought to be responsible for the rising incidence of diseases and cancers with age, as a primary cause of immunosenescence. Despite this, the thymus shows great regenerative capacities following acute involution induced by exposure to different stresses (e.g. infection or radiations). Interestingly, the thymus function is also greatly affected by sex hormones. Ablation or injection of sex hormones leads to thymic hypertrophy and atrophy respectively, and the increase in estrogens and progesterone associated with pregnancy also lead to thymic involution. Therefore, we sought to determine which molecular and cellular mechanisms modulate thymic function in adults, in order to understand which factors are essential for thymic regeneration. As the production of T cells in the thymus is regulated mostly by the stromal cells, we focused our analyses on thymic epithelial cells (TECs), the main cellular component of the thymic stroma.

We first studied the effect of sex hormones on adult TECs phenotype and transcriptome. We found that androgens particularly affected cortical TECs (cTECs), leading to a decreased expression of genes essential for thymopoiesis and reduced proliferation. We next wanted to identify the thymic epithelial progenitor cells, as the cells responsible for the maintenance and regeneration of the thymic epithelium. We found a sub-population of cTECs that were quiescent, radioresistant and that proliferated actively in the first days of regeneration following an acute involution induced by sublethal irradiation. Finally, we studied TECs' phenotype and gene expression during postpartum thymic regeneration, to identify events driving thymic growth. Surprisingly, despite a 70% reduction in total thymic mass and cellularity, no cellular loss was observed in the thymic epithelium during pregnancy. Furthermore, no TEC expansion is needed

to trigger thymic regeneration. Instead, cTECs showed important phenotypic and transcriptomic changes during the first days of regeneration, including upregulation of *Foxn1* and its targets. Lastly, our results suggest that *Klf4* could be an important regulator of thymic growth and involution, as an effector of hormonal signaling. Globally, our work highlights the importance of cTECs in the regulation of thymic involution and regeneration, as well as identifies *Klf4* as a novel potential regulator of thymic function.

Keywords: Thymus, Regeneration, Stem cells, Sex steroids, Thymic epithelial cells, Development, Thymic involution

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Figures supplémentaires	xii
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements	xvi
Chapitre 1 - Introduction	1
1.1 Avant-propos	1
1.2 La fonction thymique.....	1
1.2.1 Pourquoi un thymus?	1
1.2.2 L'organisation morphologique du thymus	3
1.2.3 Le développement des cellules T	4
1.3 Le développement des TEC	11
1.3.1 Cellules progénitrices de l'épithélium thymique	11
1.3.2 Facteurs impliqués dans la différenciation des TEC.....	13
1.3.3 Hétérogénéité des sous-populations de TEC	15
1.4 L'involution thymique.....	19
1.4.1 Involution chronique : âge et hormones sexuelles	21

1.4.2 Involution aiguë : Métabolisme, infection et autres facteurs de risques ..	22
1.4.3 Immunosénescence VS sénescence cellulaire	24
1.5 La régénération thymique	27
1.5.1 <i>Foxn1</i> et autres gènes importants dans la thymopoïèse.....	27
1.5.2 Blocage de la signalisation par les hormones stéroïdiennes	29
1.5.3 Facteurs de croissance et TGF- β	29
1.5.4 Interleukines (IL) 7, IL21 et IL22	30
1.5.5 Thérapies cellulaires.....	31
1.6 Présentation des chapitres.....	33
Chapitre 2 - Étude intégrative de l'impact des hormones sexuelles sur les cellules épithéliales thymiques.....	35
2.1 Résumé.....	35
2.2 Contributions	36
2.3 Référence de publication	36
2.4. Article	37
2.4.1 Abstract.....	38
2.4.2 Introduction.....	39
2.4.3 Results	41
2.4.4 Discussion.....	54
2.4.5 Methods	57
2.4.6 Acknowledgements.....	59
2.4.7 Authors contributions.....	60

2.4.8 Additional information.....	60
2.4.9 Competing financial interests.....	60
Chapitre 3 - Identification de progéniteurs quiescents et radio-résistants dans l'épithélium thymique adulte.....	61
3.1 Résumé.....	61
3.2 Contributions	62
3.3 Référence de publication	62
3.4 Article	63
3.4.1 Abstract.....	63
3.4.2 Introduction.....	65
3.4.4 Results	68
3.4.5 Discussion.....	83
3.4.3 Materials and methods	86
3.4.6 Conflict of Interest.....	90
3.4.7 Authors contributions.....	90
3.4.8 Funding.....	90
3.4.9 Acknowledgments	90
3.4.10 Additional information.....	91
Chapitre 4 - Régénération thymique postpartum	92
4.1 Résumé.....	92
4.2 Introduction au projet.....	93
4.3 Résultats.....	96

4.3.1 L'épithélium thymique ne subit pas de pertes cellulaires pendant la grossesse.....	96
4.3.2 <i>Foxn1</i> est impliqué dans la régénération thymique postpartum.....	98
4.3.3 Les cTEC induisent la régénération thymique	101
4.3.4 Les mTEC se différencient suite à l'expansion des thymocytes SP4.....	105
4.3.5 <i>Klf4</i> comme potentiel régulateur de la croissance thymique	107
4.4 Discussion.....	113
4.6 Matériels et méthodes	116
4.6.1 Souris.....	116
4.6.2 Digestion du stroma thymique.....	116
4.6.3 Cytométrie en flux.....	117
4.6.4 Séquençage de l'ARNm.....	117
4.6.5 Prédiction des sites de liaison de facteurs de transcription	118
4.7 Contributions	118
Chapitre 5 - Discussion.....	119
Références	126
Annexes	i
6.1 Annexe I.....	i
6.1.1 Supplemental figures	ii
6.2 Annexe II.....	vi
6.2.1 Supplementary experimental procedures	vii
6.2.2 Supplementary Figures	viii

6.2.3 Supplementary Table	xii
6.3 Annexe III	xiii
6.3.1 Tables supplémentaires	xiii

Liste des tableaux

Table 1.1 Étapes de développement des thymocytes $\alpha\beta$ TCR+	5
Table 1.2 Caractéristiques des progéniteurs bipotents décrits chez l'adulte	12
Table 1.3 Rôle des facteurs de transcription essentiels à l'organogenèse du thymus... 14	
Table 1.4 Résumé des rôles connus des différents types de TEC.....	18
Table 1.5 Cytokines impliquées dans la thymopoïèse.....	28
Table 4.1 Expression des gènes impliqués dans la thymopoïèse chez les cTEC.....	105
Table 4.2 Sommaire des sites de liaison des familles V\$EREF et V\$GREF dans le promoteur de <i>Foxn1</i>	108
Table 4.3 Sites de liaison des <i>Klf2/4/6/9</i> dans le promoteur de <i>Foxn1</i>	111
Supplementary Table S2.1 Antibodies used for immunofluorescence microscopy (IFM) and flow cytometry (FC) analyses	vii
Table Supplémentaire S2.2 Comparison of the cell surface phenotype of UEA1– LRCs with that of TEPCs identified in other reports	xii
Table Supplémentaire S3.1 Top 10 des familles de sites de liaison dans la région promotrice de <i>Foxn1</i>	xiii
Table Supplémentaire S3.2 Réactifs utilisés pour les analyses en cytométrie en flux .xiv	

Liste des figures

Figure 1.1 Morphologie du thymus.....	4
Figure 1.2 Modèle proposé de différenciation des TEC	16
Figure 2.1 Male mice show an accumulation of cTECs with age that is not due to enhanced cell proliferation	42
Figure 2.2 Transcriptomic signatures of cTECs and mTECs in 6 month-old male, female and Cx male mice	45
Figure 2.3 IPA analysis of DEGs in cTECs and mTECs.....	47
Figure 2.4 Relative expression of genes contributing to the inhibition of cell death and cell differentiation in male TECs.....	49
Figure 2.5 Several TEC genes involved in thymopoiesis are downregulated in male TECs	51
Figure 2.6 Cx male show higher expression of TRAs	53
Figure 3.1 Most LRCs are K5+K8+ and localized near the CMJ	70
Figure 3.2 LRCs are found in clusters at the CMJ	72
Figure 3.3 UEA1– LRCs participate to thymic regeneration following SL-TBI	74
Figure 3.4 Cell surface markers of UEA1– LRCs.....	77
Figure 3.5 UEA1– NonLRCs are well adapted to communicate with hematopoietic cells	78
Figure 3.6 Transcriptomic analysis of UEA1– LRCs reveals potential regulators of TEPCs.....	79
Figure 4.1 La régénération précoce n'est pas associée à une expansion de l'épithélium thymique	97
Figure 4.2 Schéma expérimental d'analyses transcriptomiques	99
Figure 4.3 <i>Foxn1</i> est impliqué dans la régénération postpartum précoce	100

Figure 4.4 Les changements phénotypiques des cTEC précèdent l'expansion des DN	103
Figure 4.5 Le maintien des mTEC matures nécessite la présence des thymocytes SP4	106
Figure 4.6 <i>Klf4</i> est inhibé pendant la régénération précoce.....	110
Figure 5.1 <i>Klf4</i> est associé à une prolifération limitée pendant la régénération post-irradiation.....	125

Figures supplémentaires

Supplementary Figure S1.1 Experimental design for phenotypic and transcriptomic analyses of male, female and Cx male TECs.....	ii
Supplementary Figure S1.2 Differentially activated functions in cTECs according to IPA analysis	iii
Supplementary Figure S1.3 Differentially activated functions in mTECs according to IPA analysis	iv
Supplementary Figure S2.1 Identification of LRCs on thymic slices	viii
Supplementary Figure S2.2 Gating strategy for GFP ⁻ , GFP ^{int} and GFP ^{hi} TECs.....	ix
Supplementary Figure S2.3 Histological analysis of GFP ⁺ TECs	x
Supplementary Figure S2.4 BrdU incorporation in proliferating TECs is higher on day 7 post-irradiation than in non-irradiated controls	xi

Liste des abréviations

7-AAD	7-aminoactinomycine D
AHCT	<i>allogenic hematopoietic cell transplantation</i>

BrdU	Bromodéoxyuridine
BCR	<i>B cell receptor</i>
CMJ	<i>cortico-medullary junction</i>
CMR	<i>cortico-medullary region</i>
cTEC(s)	<i>cortical thymic epithelial cell(s)</i>
Cx	<i>castrated</i>
DEG(s)	<i>differentially expressed gene(s)</i>
DC	<i>dendritic cells (conventional: cDC, plasmacytoid: pDC)</i>
DN	<i>thymocytes double-négatifs</i>
DP	<i>thymocytes double-positifs</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
FPKM	<i>fragments per kilobase of transcript per million mapped reads</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GO	<i>gene ontology</i>
H2B	<i>histone 2B</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
LRC(s)	<i>label retaining cell(s)</i>
MFI	<i>median fluorescence intensity</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTEC(s)	<i>medullary thymic epithelial cell(s)</i>
NK	<i>Natural killer cells</i>
pMHC-I/II	<i>Complexes peptide-MHC de classe I ou II</i>
RFTOC	<i>Reaggregated fetal thymic organ culture</i>
RNA-seq	<i>RNA sequencing (séquençage d'ARN messenger)</i>
RPKM	<i>reads per kilobase of exon model per million reads mapped</i>
rtTA	<i>reverse tetracycline transactivator</i>
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SL-TBI	<i>sublethal total body irradiation</i>
SP (4 ou 8)	<i>thymocytes simple-positifs (CD4+ ou CD8+)</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TEC(s)	<i>thymic epithelial cell(s)</i>

TEPC(s)	<i>thymic epithelial progenitor cell(s)</i>
TRA(s)	<i>tissue restricted antigens</i>
UEA1	Ulex Europaeus Agglutinin I

*"You are always you, and that don't change,
and you're always changing, and there's nothing you can do about it."*

The Graveyard Book
– Neil Gaiman

Remerciements

Je complète en ce moment ma 7^e année de recherche dans le laboratoire du Dr. Perreault. Sept années de défis, de découvertes stimulantes et de déceptions parfois difficiles à surmonter, mais surtout d'apprentissages nombreux, autant sur le plan humain que scientifique. À travers ce chemin parfois sinueux, j'ai toujours pu compter sur le soutien et les conseils de mon directeur qui, au fil des années, m'a laissée prendre le contrôle de mes projets de recherche. Je ne peux exprimer toute la gratitude que je ressens pour les opportunités et la confiance qu'il m'a données. Merci infiniment, Claude, ce fût un immense plaisir de travailler avec vous.

Je remercie également mes collaborateurs de recherche, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à discuter : Lucyle Depoërs, Yahya Benslimane, Jérémie Zumer, Sébastien Lemieux, Rebecca Panès, Étienne Gagnon, Moutih Rafei, Mohamed Benhammadi, Sylvie Brochu, Hervé Gerbe, Albert Feghaly, Isabelle Caron, Julie Gervais, Danièle Gagné, Gaël Dulude, Annie Gosselin, Jennifer Huber, Raphaëlle Lambert, Julie Hinsinger, Micheline Fortin. Merci également aux membres présents et passés du laboratoire, à tous ceux avec qui j'ai organisé divers événements dans l'association étudiant(e)s, ainsi qu'aux employé(e)s de l'IRIC avec qui nous avons collaborés.

Je remercie également ma famille qui m'a soutenue pendant ces longues années d'études. Mes parents qui m'ont toujours encouragée dans mes projets et mes études et m'ont accueillie à nouveau dans leur chez-soi pendant la rédaction de cette thèse. Merci également à ma sœur, Élise Dumont-Lagacé, pour son écoute, et pour sa relecture minutieuse de ma thèse.

Et enfin, je veux remercier spécialement Tariq Daouda, mon partenaire de vie, pour tout ce qu'il m'a enseigné : ses techniques de rédaction, la programmation, le courage, la persévérance, l'efficacité, la pensée formelle, etc. Sans son aide et son soutien,

le doctorat aurait été beaucoup plus difficile. Tariq, tu es une source d'inspiration constante et j'ai hâte de voir ce qui nous attend dans le futur.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Avant-propos

Notre système immunitaire est notre système de défense. Il est responsable de la détection et de l'élimination des agents pathogènes et cellules cancéreuses. Cependant, le système immunitaire perd de son efficacité et de sa spécificité avec l'âge, un processus désigné par le terme « immunosénescence ». L'immunosénescence se manifeste par un ensemble de changements graduels se produisant dans les différentes populations de cellules immunitaires, résultant globalement en une plus grande susceptibilité aux infections, aux cancers, ainsi qu'aux conditions pathologiques reliées à l'inflammation (e.g. maladies cardiovasculaires) ou à l'autoimmunité (e.g. arthrite rhumatoïde)¹. L'un des changements les plus marquants dans l'immunité avec l'âge est l'atrophie du thymus, ou involution thymique. Elle est caractérisée par une diminution graduelle du volume fonctionnel du thymus avec l'âge ainsi qu'une désorganisation de l'architecture du tissu, menant à une réduction de la production de lymphocytes T naïfs^{2,3}. Ce phénomène étant une des causes majeures de l'immunosénescence, il est donc nécessaire de trouver comment régénérer le thymus, afin de restaurer sa fonction chez l'adulte.

1.2 La fonction thymique

1.2.1 Pourquoi un thymus?

L'efficacité du système immunitaire dérive directement de sa capacité à distinguer les tissus sains de l'organisme d'une grande variété de pathogènes, ou en d'autres mots, de distinguer le soi du non-soi. Chez les vertébrés, le système immunitaire est conceptualisé en deux composantes : le système inné et le système adaptatif. D'une part,

l'immunité innée agit en tant que première ligne de défense : son action est rapide, mais peu spécifique⁴. D'autre part, le système immunitaire adaptatif permet le développement d'une réponse spécifique, plus robuste, ainsi que l'établissement d'une mémoire immunitaire. Les récepteurs responsables de la reconnaissance des antigènes du non-soi impliqués dans la réponse adaptative, i.e. les récepteurs des cellules T (TCR) et des cellules B (BCR), ne sont pas encodés dans l'ADN à la naissance, mais sont plutôt produits par recombinaison génétique, c'est-à-dire la synthèse *de novo* de séquences d'ADN aléatoires⁴. Ce processus étant sujet aux erreurs, il nécessite donc un système de vérification. Les cellules compétentes, i.e. pour lesquelles la recombinaison génétique a produit un récepteur fonctionnel, seront conservées, mais seulement si elles ne reconnaissent pas d'antigènes du soi. L'évaluation de la fonctionnalité du récepteur s'appelle sélection positive, alors que l'élimination des récepteurs auto-réactifs est appelée sélection négative⁴.

Le système immunitaire adaptatif est composé de lymphocytes B et T⁴. Le développement de ces deux types de cellules nécessite la recombinaison de leur récepteur, mais leur sélection se déroule de façons très différentes. D'une part, les lymphocytes B, ou cellules B, sont responsables de la production des anticorps, qui se lient directement à différents types de molécules. Leur sélection nécessite donc la rencontre de divers antigènes circulant dans le compartiment extra-cellulaire. Le développement des cellules B se produit d'abord dans la moelle osseuse, où le réarrangement du BCR (*B cell receptor* ou immunoglobulines) est testé (sélection positive)⁵. La sélection négative s'effectue à la fois dans la moelle osseuse et en périphérie⁵. D'autre part, les lymphocytes T « voient » leur environnement à travers les interactions entre leur récepteur de cellule T (TCR, *T cell receptor*) et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC, *major histocompatibility complex*) des cellules environnantes⁴. Leur sélection nécessite donc l'intervention de cellules spécialisées dans

la présentation antigénique par les molécules MHC de classe I et II. De plus, les lymphocytes T CD4 régulent la maturation, l'activation ou l'inhibition d'autres cellules immunitaires (cellules B, macrophages, lymphocytes T cytotoxiques CD8)⁶. Il est donc primordial que les cellules T auto-réactives soient éliminées, afin d'éviter une réaction auto-immune, tout en conservant un maximum de cellules T qui pourraient reconnaître des antigènes dérivant de pathogènes. Ainsi, la sélection des cellules T doit se faire dans un environnement présentant des antigènes représentatifs de l'ensemble du « soi » aux cellules T en développement, afin d'éliminer les cellules auto-réactives. Cet environnement est le thymus et ces cellules spécialisées sont les cellules épithéliales thymiques (TEC).

1.2.2 L'organisation morphologique du thymus

Le thymus est composé d'une région corticale à haute densité cellulaire et d'une région médullaire (voir Figure 1.1, p. 4). On divise les types de cellules contenues dans le thymus en deux catégories : cellules lymphoïdes et stromales. Les cellules lymphoïdes regroupent les précurseurs des cellules T en développement, appelés thymocytes dans le thymus, ainsi que les cellules dendritiques, alors que les cellules stromales réfèrent aux cellules épithéliales, mésenchymateuses (fibroblastes, adipocytes) et endothéliales du thymus. Comme le thymus contient environ 500 fois plus de thymocytes que de TEC⁷, les thymocytes en développement doivent établir une étroite communication avec le stroma environnant, et principalement avec les TEC, afin de coordonner leur migration à travers le stroma thymique, d'abord vers la région subcapsulaire corticale, puis vers la médulla. Les TEC montrent des caractéristiques phénotypiques différentes, associées à leur rôle dans la régulation du développement des thymocytes, selon leur emplacement dans le thymus. Les TEC corticales (cTEC) sont impliquées dans les premières étapes de développement des thymocytes, ainsi que dans la sélection positive. Les TEC médullaires

(mTEC) permettent l'établissement de la tolérance au soi, par l'élimination des thymocytes auto-réactifs (sélection négative) grâce à leur expression ectopique de gènes tissus-spécifiques (en anglais : *promiscuous gene expression*). Nous verrons dans la première partie comment les TEC régulent chaque étape du développement des cellules T, puis nous discuterons du développement des TEC, des causes et conséquences de l'involution thymique et des mécanismes connus impliqués dans la régénération thymique.

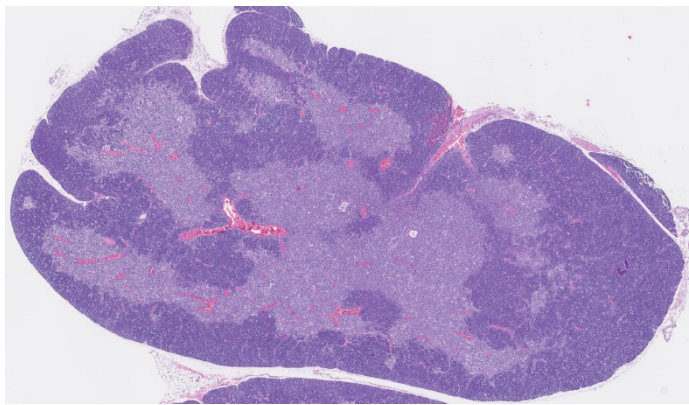


Figure 1.1 | Morphologie du thymus

Le thymus est composé d'un cortex à haute densité cellulaire (violet foncé) et d'une médulla (violet pâle), de plus faible densité. On appelle région subcapsulaire la région du cortex la plus distale à la médulla. Marquage à l'hématoxyline-éosine.

1.2.3 Le développement des cellules T

Le développement des cellules T, ou thymopoïèse, requiert une succession d'événements de signalisation précis, qui doivent se produire au bon endroit et au bon moment. La table 1.1 (p.5) résume les différentes étapes de développement des cellules T, ainsi que les événements importants se produisant à chacune de ces étapes.

Pendant leur développement, les thymocytes doivent être en étroite et constante communication avec les cellules stromales thymiques, parfois à proximité, parfois à distance. Bien que plusieurs cellules stromales participent au développement des thymocytes, les TEC y jouent un rôle essentiel et non remplaçable, tant dans la régulation de la migration des thymocytes et de leur différenciation, que dans les sélections positive et négative. Plusieurs types de cellules T sont produites dans le thymus, mais les cellules

T majoritaires sont les cellules $\alpha\beta$ TCR+. Celles-ci comprennent les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) et régulateurs (CD4+CD25+Foxp3+) et les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+). Les autres types de cellules se développant dans le thymus comprennent les cellules T $\gamma\delta$, les NKT invariants (*invariant natural killer T cells*, iNKT) et les précurseurs des lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ + TCR $\alpha\beta$ intraépithéliaux du tractus gastrointestinal (*intraepithelial lymphocytes*, IELs)⁸. Par souci de concision, nous limiterons notre discussion aux étapes de développement des cellules T classiques $\alpha\beta$ TCR+ et au rôle des cellules stromales, et particulièrement des TEC, dans leur développement. Les prochaines sections présenteront en détails les différentes étapes de développement des cellules T ainsi que le rôle des TEC dans la régulation de ce processus.

Table 1.1 | Étapes de développement des thymocytes $\alpha\beta$ TCR+

THYMOCYTE	PHÉNOTYPE	ÉVÉNEMENTS IMPORTANTS DU DÉVELOPPEMENT
DN1	CD4-CD8- CD25-CD44+	Entrée dans le thymus Début de la spécification de la lignée T
DN2	CD4-CD8- CD25+CD44+	Début de la migration vers le cortex Fin de la spécification de la lignée T
DN3	CD4-CD8- CD25+CD44-	Réarrangement de la chaîne TCR β Expression du complexe pré-TCR Sélection β , permettant le sauvetage des thymocytes de la mort par négligence
DN4	CD4-CD8- CD25-CD44-	Vague proliférative
DP	CD4+CD8+	Réarrangement de la chaîne TCR α Sélection positive Détermination de la lignée CD4 ou CD8
SP4 ET SP8	CD4+CD8- ou CD4-CD8+	Migration vers la médulla Sélection négative

1.2.3.1 Entrée des précurseurs lymphoïdes dans le thymus

Les précurseurs lymphoïdes se développent dans la moelle osseuse, puis doivent migrer vers le thymus pour poursuivre leur développement vers la lignée T. Leur

importation dans le thymus se fait au niveau des veinules postcapillaires situées à la jonction cortico-médullaire^{9,10}. L'entrée des précurseurs est régulée en partie par les TEC, via l'expression des chimiokines CCL25, CCL21 et CXCL12¹¹⁻¹⁵, mais aussi par les cellules endothéliales, qui expriment P-selectin (nécessaire à l'importation par extravasation)^{16,17}, ainsi que la forme membranaire de KITL (mKitL), CCL25 et CXCL12¹⁷⁻¹⁹. Chez l'adulte, l'importation de nouveaux précurseurs se produit de façon cyclique²⁰. En effet, l'expression de P-selectin et de CCL25 par les cellules endothéliales thymiques covarient dans le temps, un phénomène régulé au moins en partie par la présence de lymphocytes T en périphérie¹⁷. Les précurseurs lymphoïdes intrathymiques sont capables d'auto-renouvellement, mais l'importation de nouveaux précurseurs cause une compétition pour les niches stromales, particulièrement au stade DN3, menant au remplacement éventuel des précurseurs lymphoïdes du thymus par de nouvelles cellules provenant de la moelle osseuse^{21,22}.

1.2.3.2 Différenciation des thymocytes DN et réarrangement du TCR

À leur entrée dans le thymus, les précurseurs sont CD44+, Kit+, CD25- et CD4-CD8- (double-négatifs, DN). Ils resteront dans la région corticale à proximité de la médulla, près de leur site d'entrée, pendant en moyenne 10 jours avant de poursuivre leur développement²³. Au stade DN2 (CD44+, CD25+), les thymocytes augmentent leur expression de CXCR4 (le récepteur pour CXCL12), ce qui leur permet d'amorcer leur migration vers la région subcapsulaire du cortex^{24,25}. Le réarrangement du TCR β est amorcé au stade DN3 (CD44-, CD25+), alors que les thymocytes sont dans la zone subcapsulaire où la densité des cTEC est la plus grande²³. Suite au réarrangement du TCR β , les DN3 expriment le complexe pré-TCR à leur surface, formé par le TCR β nouvellement réarrangé et le pré-TCR α (on appelle cette étape la sélection β). Si le réarrangement du TCR β produit un pré-TCR fonctionnel, le thymocyte passera au stade DN4 (CD44-, CD25-)²⁶, pendant lequel il entreprendra une vague de prolifération²⁷,

activera l'expression des molécules CD4 et CD8 (corécepteurs des TCR) pour devenir double-positifs (DP) et procédera au réarrangement du TCR α ^{23,28}.

Ce sont les cTEC se trouvant à proximité des DN qui leur fournissent les signaux nécessaires à leur développement vers le stade DN2 : DLL4, essentiel à la détermination de la différenciation des précurseurs vers la lignée T et mKitL, nécessaire à la survie et la différenciation des DN1^{11,18}. Les cTEC expriment également CCL25 et CXCL12, impliqués à la fois dans la migration vers la région subcapsulaire du cortex et dans la survie et la différenciation des DN^{19,25,29-31}. Enfin, l'arrangement réticulaire et tridimensionnel des cTEC dans le cortex pourrait également contribuer au support de la sélection positive des thymocytes en favorisant les interactions avec les nombreux thymocytes DP⁸. La synthèse *de novo* des TCR produit souvent un récepteur non fonctionnel, menant à la mort par négligence d'un grand nombre de thymocytes. Ainsi, afin de favoriser la sélection positive des thymocytes dont le TCR β est fonctionnel (vérifié par la sélection β), une sous-population de cTEC appelée *thymic nurse cells* englobent les thymocytes DP afin de favoriser leur survie, particulièrement pendant le réarrangement secondaire de la chaîne TCR-V α ³². En effet, un thymocyte dont le premier réarrangement de la chaîne TCR α n'aurait pas produit un TCR fonctionnel subira plusieurs cycles séquentiels de réarrangement du TCR α , permettant au thymocyte de subir plusieurs tours de sélection positive et augmentant ainsi la probabilité que ce thymocyte réussisse l'étape de sélection positive³³.

1.2.3.3 La sélection positive par les cTEC

Lorsque le réarrangement du TCR α est complété, les DP doivent recevoir un signal par leur TCR de force intermédiaire pour survivre³⁴. Cela constitue la sélection positive, qui précède la détermination de la lignée T (CD4 ou CD8). La force du signal TCR dépend de l'affinité du TCR pour le complexe peptide-MHC : alors qu'un signal fort se traduira

par un influx calcique (Ca^{2+}) prononcé et soutenu dans le temps qui induira un arrêt de la migration du thymocyte et éventuellement son élimination, un signal de force intermédiaire se traduira par des influx calciques modérés et intermittents, entrecoupés de courtes périodes de migration du thymocyte³⁵. Suite à la sélection positive, l'expression de CD8 cesse et son expression à la surface diminue. Si le signal TCR persiste, le thymocyte exprimera le facteur de transcription Th-POK (encodé par le gène *Zbtb7b*), qui permettra sa différenciation vers la lignée T CD4⁺³⁶. À l'opposé, si le signal TCR cesse, *Runx3* est exprimé, permettant la différenciation vers la lignée T CD8⁺³⁷⁻³⁹. Seules les interactions entre le TCR recombiné et les complexes peptide-MHC (pMHC) présentés par les cTEC permettront la survie des thymocytes au-delà du stade DP.

Les cTEC semblent présenter un répertoire de pMHC particuliers grâce à leur machinerie de dégradation protéique unique. Les pMHC de classe I (pMHC-I) sont produits principalement par la dégradation protéique provenant du protéasome⁴⁰. Les cTEC expriment *Psmb11*, aussi appelé $\beta 5t$, une sous-unité du protéasome spécifique aux cTEC et nécessaire au développement des cellules T CD8^{+41,42}. Comme les niveaux d'expression de MHC-I par les cTEC des souris *Psmb11*^{-/-} n'est pas altéré, l'hypothèse prédominante à ce jour expliquant la sélection défectueuse des CD8 est que le répertoire des pMHC-I est altéré en absence de *Psmb11*⁴³. En effet, les pMHC-I produits par *Psmb11* montrent des patrons de clivage distincts ainsi qu'une affinité plus faible pour le TCR, mais sont capables d'induire la sélection positive des cellules T CD8 *in vitro*⁴⁴. Cependant, la nécessité de ces peptides pour la sélection des CD8 *in vivo* n'a pas été directement démontrée.

Les molécules MHC-II lient principalement des peptides produits par les voies endosomales et lysosomales³⁴ et impliquent donc d'autres protéases. L'expression de cathepsin-L (*Ctsl*), une protéase lysosomale spécifique aux cTEC, est nécessaire à la sélection positive des cellules T CD4. Elle permet le clivage de la chaîne invariante (Ii) qui

protège contre la liaison prématurée d'un peptide au MHC-II, et participe à la génération du répertoire de pMHC-II. Son absence entraîne une réduction marquée de la population simple positive CD4⁺ (SP4)⁴⁵. PRSS16, une protéase endosomale spécifique aux cTEC, est également nécessaire au développement des cellules T CD4⁴⁶. Bien que le nombre de thymocytes SP4 ne soit pas altéré en absence de *Prss16* chez la souris⁴⁷, la sélection positive des thymocytes ayant certaines spécificités de TCR est altérée⁴⁶. Les cTEC expriment aussi CD83, un gène permettant la stabilisation des pMHC-II à la surface cellulaire^{48,49}, et son absence résulte en une diminution du nombre de thymocytes SP4^{49,50}. Enfin, les cTEC montrent un haut niveau d'autophagie constitutive^{51,52}, permettant la présentation de peptides cytoplasmiques par les MHC-II⁵³. Collectivement, ces évidences démontrent l'importance de la présentation antigénique unique des cTEC dans la sélection positive des cellules T.

1.2.3.4 Tolérance centrale et sélection négative

Lorsque les thymocytes deviennent simple-positif (SP) CD4⁺CD8⁻ (SP4) ou CD4⁺CD8⁺ (SP8), ils réexpriment CCR7 et répriment l'expression de CXCR4, déclenchant leur migration rapide vers la médulla, où ils subiront la sélection négative, nécessaire à l'établissement de la tolérance au soi⁵⁴⁻⁵⁷. La sélection négative consiste en la délétion clonale des thymocytes possédant un TCR de haute affinité pour un pMHC du soi. Celle-ci débute dans le cortex, où un grand nombre de thymocytes DP sont directement éliminés par délétion clonale suite à une stimulation trop forte de leur TCR⁵⁸. Cette délétion ne semble pas être effectuée par les cTEC, mais plutôt par une population rare de cellules dendritiques (DC) corticales⁵⁹. De plus, les thymocytes peuvent eux-mêmes induire la sélection négative pour les antigènes spécifiques aux cellules T⁶⁰, participant potentiellement à la délétion clonale corticale. Toutefois, le séjour des thymocytes dans la médulla est nécessaire à l'élimination des cellules T auto-réactives^{34,61}. En effet, les mTEC présentent une grande variété de pMHC du soi, représentant virtuellement tous les tissus

du corps, grâce à l'expression ectopique de gènes tissus-spécifiques (*promiscuous gene expression*), possible en partie grâce au gène *Aire*⁶²⁻⁶⁴. La médulla contient également trois populations de cellules dendritiques (DC) qui participent à la sélection négative : (1) les DC conventionnelles résidant dans le thymus (cDC1), (2) les DC conventionnelles provenant de la périphérie (cDC2) et (3) les DC plasmacytoïdes (pDC). Les cDC1, qui expriment XCR1, sont spécialisées dans la présentation d'antigènes provenant des mTEC⁶⁵⁻⁶⁷. Les cDC2, qui expriment SIRP α , ainsi que les pDC peuvent importer des antigènes de la périphérie^{68,69}. Finalement, le thymus contient également des cellules B, capables d'induire la délétion clonale^{70,71}, mais l'importance de ce phénomène dans l'induction de la tolérance au soi n'est pas connue^{72,73}.

1.3 Le développement des TEC

Comme les TEC sont au cœur de la régulation du développement des lymphocytes T, elles sont devenues des cibles intéressantes pour la thérapie cellulaire, tant dans le cadre de déficiences immunitaires que de maladies auto-immunes⁷⁴. Plusieurs études ont été entreprises dans le but (1) d'identifier les cellules souches/progénitrices de l'épithélium thymique, tant dans le développement embryonnaire que chez l'adulte, (2) l'identification des voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cTEC et des mTEC, que (3) l'identification des différents sous-types de cTEC et de mTEC. Les prochaines sections résument l'état des connaissances actuelles sur le développement des TEC, l'identité des progéniteurs et les différents sous-types de TEC.

1.3.1 Cellules progénitrices de l'épithélium thymique

L'épithélium thymique origine de l'endoderme, se formant chez la souris autour du 9^e jour de développement embryonnaire à partir de la 3^e poche pharyngienne⁷⁵. Pendant le développement embryonnaire, les cTEC et les mTEC dérivent d'un progéniteur bipotent (i.e. capable de se différencier en cTEC et en mTEC)^{76,77}, caractérisé par l'expression de marqueurs associés aux cTEC (CD205, IL7 et $\beta 5t$)⁷⁸⁻⁸¹. Toutefois, plusieurs évidences pointent vers la présence de progéniteurs spécifiés (*lineage-committed*) pendant le développement embryonnaire, pour les cTEC et pour les mTEC. En effet, le thymus postnatal contient trois types d'ilots clonaux (i.e. dérivant d'une seule cellule) : (1) composé de cTEC et de mTEC, (2) composé de cTEC seulement ou (3) composé de mTEC seulement^{76,82}. Il semble donc probable que ces deux types de progéniteurs (bipotents et unipotents) participent au développement des TEC.

Bien que l'existence d'un progéniteur bipotent pendant le développement embryonnaire ait été démontré il y a plus d'une décennie, leur existence chez l'adulte est longtemps restée spéculative. La présence de progéniteurs bipotents dans le stroma thymique adulte a récemment été démontrée par trois équipes de recherche⁸³⁻⁸⁵. Cependant, les phénotypes des différents progéniteurs décrits par ces trois études indépendantes sont mutuellement exclusifs (voir table 1.2, p.12) et leur contribution à la maintenance physiologique du thymus adulte reste à déterminer.

Table 1.2 | Caractéristiques des progéniteurs bipotents décrits chez l'adulte

Étude	EpCAM	UEA1	MHCII	Analyse	Autres
Wong <i>et al</i> , 2014	+	–	Lo	RFTOC	$\alpha 6$ -integrin-hi, Sca1-hi
Ulyanchenko <i>et al</i> , 2016	+	–	Hi	RFTOC	Plet1+Ly51+
Ucar <i>et al</i> , 2014	–	–	–	Thymospheres	<i>s.o.</i>

N.B. RFTOC : *reaggregate fetal thymic organ culture*

Enfin, il existe également des progéniteurs unipotents chez l'adulte, dont la contribution à la maintenance de l'épithélium semble plus importante chez l'adulte. En effet, Ohigashi *et al* (2015) ont démontré que dans le thymus postnatal, les mTEC dérivait majoritairement de progéniteurs $\beta 5t$ - dès une semaine d'âge, alors que les cTEC continuaient de provenir de progéniteurs $\beta 5t^{+78}$. Deux phénotypes différents ont été décrits pour les progéniteurs spécifiés des mTEC :

1. Cld3/4+ SSEA1^{hi}, présentes à la fois dans l'embryon et chez l'adulte, dont l'activité clonogénique décline en présence de thymopoïèse active^{86,87}.
2. CCL19+ Podoplanin+, situées à la jonction cortico-médullaire⁸⁸.

Nous ignorons toutefois si ces deux phénotypes décrivent la même population de progéniteurs, puisque leurs phénotypes ne sont pas mutuellement exclusifs. Quant aux

cTEC, elles semblent également pouvoir dériver d'un progéniteur unipotent. En effet, Ulyanchenko *et al* (2016) ont montré que la contribution des TEC Plet1-Ly51+ dans des thymus fœtaux réaggrégés (*reaggregate fetal thymic organ culture*, RFTOC) transplantés *in vivo* était restreinte aux cTEC⁸⁴.

Ainsi, bien que plusieurs avancées aient été effectuées dans la dernière décennies quant à l'identification des progéniteurs de l'épithélium thymique chez l'adulte, aucun consensus clair n'a pu être établi quant à leurs caractéristiques moléculaires. Alors que certaines études démontrent l'existence de progéniteurs bipotents chez l'adulte, d'autres apportent des évidences montrant que la maintenance des cTEC et des mTEC s'effectuent plutôt par des progéniteurs unipotents. Enfin, l'existence de différents phénotypes décrivant les progéniteurs bipotents des TEC suggèrent qu'il pourrait y avoir plusieurs populations de TEC possédant des capacités progénitrices, qui pourraient être activées à différents stades de développement ou encore en réponse à différents stimuli externes⁸. De plus, les caractéristiques définissant les différentes sous-populations de progéniteurs du thymus embryonnaire pourraient différer chez l'adulte. Par exemple, 80-90% des progéniteurs mTEC-spécifiques (Cld3/4+, SSEA1-1^{hi}) expriment $\beta 5t$ au jour embryonnaire 14.5 (E14.5), mais ne l'expriment plus chez l'adulte à cinq semaines d'âge⁷⁸.

1.3.2 Facteurs impliqués dans la différenciation des TEC

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la croissance du primordium thymique à partir de la 3^e poche pharyngienne de l'endoderme : *Foxn1*, *Hoxa3*, *Pax1/9*, *Eya1*, *Six1/4* et *Tbx1*. L'absence d'un de ces facteurs provoque un arrêt complet de développement (absence complète du thymus) ou une insuffisance sévère du thymus (hypoplasie menant à une production fortement réduite des cellules T)⁸⁹. L'impact de l'absence de chaque facteur de transcription sur l'organogenèse du thymus est détaillé dans la table 1.3 (p.14). L'expansion des TEC nécessite également le récepteur

FGFR2, et ses ligands FGF7 et FGF10, produits par les fibroblastes thymiques^{90,91}. De plus, les voies de signalisation BMP (via BMP4), WNT (via WNT4 et WNT5B) et SHH sont également importantes dans la spécification et la prolifération des TEC dans l'embryon⁹²⁻⁹⁷.

Le facteur de transcription le plus important dans les TEC est *Foxn1*. En effet, l'expression de *Foxn1* par les TEC, détectée dès E11.5 dans l'embryon, est essentielle à la différenciation des TEC et à la thymopoïèse^{75,89,98} et son niveau d'expression est directement lié aux taux de production de lymphocytes T par le thymus⁹⁹. FOXN1 régule directement l'expression de plusieurs gènes essentiels à la fonction des TECs, impliqués dans la stimulation et la sélection des thymocytes, comme *Dll4*, *Cxcl12*, *Ccl25*, *Psmb11*, *Prss16* et *Cd83*¹⁰⁰. *Foxn1* est exprimé par toutes les TEC pendant le développement, mais son expression diminue après la naissance, jusqu'à ce qu'environ 50% des TEC seulement l'expriment à partir de 10 semaines d'âge¹⁰¹.

Table 1.3 | Rôle des facteurs de transcription essentiels à l'organogenèse du thymus

Gène	Phénotype du thymus en absence du facteur de transcription (mutants <i>knocked-out</i>)
<i>Hoxa3</i>	Aucune formation des structures pharyngiennes permettant la formation initiale de l'organe, pas de thymus (athymie) ^{102,103}
<i>Pax1</i>	Organogenèse initiale normale du thymus, puis hypoplasie légère du thymus ¹⁰⁴
<i>Pax9</i>	Échec de la séparation du thymus de la poche pharyngienne, hypoplasie extrême du thymus ¹⁰⁵
<i>Eya1</i>	Athymie, similaire à <i>Hoxa3</i> ^{106,107}
<i>Six1</i>	Organogenèse initiale normale du thymus, expression de <i>Foxn1</i> , puis les TEC meurent par apoptose ¹⁰⁶
<i>Six4</i>	Similaire au mutant <i>Six1</i> -KO, mais avec un primordium initial plus petit et aucune expression de <i>Foxn1</i> n'est détectée ¹⁰⁶
<i>Tbx1</i>	Athymie causée par l'échec de la séparation de l'organe de la poche pharyngienne ^{108,109}
<i>Foxn1</i>	Organogenèse initiale normale du thymus mais arrêt du développement au stade progéniteur; nécessaire aux développements fœtal et post-natal ⁷⁶

1.3.3 Hétérogénéité des sous-populations de TEC

Comme les cTEC partagent plusieurs caractéristiques avec les progéniteurs bipotents, leur processus de différenciation reste encore mal défini. Certains ont suggéré que la différenciation des cTEC se produisait par défaut, en absence de signaux activant la voie NF- κ B¹¹⁰. Les cTEC chez l'adulte expriment encore des hauts niveaux des facteurs de transcription nécessaires au développement précoce du thymus dans l'embryon, tels que *Pax1/9*, *Six1/4* et *Hoxa3*, suggérant que ces voies participent aussi au processus de différenciation des cTEC¹¹¹. Une récente étude transcriptomique de cellules uniques (*single-cell transcriptomic*) effectuée sur les populations du thymus pendant le développement embryonnaire a permis d'identifier 4 sous-types de cTEC qui semblent représenter différents stades de leur maturation pendant l'embryogenèse¹¹². Une d'entre elles (nommée cTEC1) semble représenter le progéniteur bipotent embryonnaire, puisqu'elle exprime certains marqueurs phénotypiques associés aux progéniteurs embryonnaires (*Psm11*, *Il7*), ainsi que les facteurs de transcription nécessaires à l'organogenèse du thymus (*Pax1*, *Six1/4*, *Hoxa3* et *Foxn1*). Ces mêmes cellules expriment également des chimiokines permettant l'import des premiers précurseurs lymphocytaires (*Cxcl12* et *Ccl25*) (voir Figure 1.2, p.16). Elles représentent environ 30% des TEC au jour embryonnaire E12.5, et leur proportion diminue jusqu'à la naissance¹¹². Une autre sous-population de cTEC décrite par la même étude (cTEC4) exprime toutes les molécules reliées à la thymopoïèse, tant dans l'attraction des précurseurs lymphoïdes (*Ccl25*, *Cxcl12*), dans l'induction de leur survie/prolifération et différenciation (*Kitl*, *Wnt4*, *Il7*), que dans la présentation antigénique nécessaire à la sélection positive (*Psm11*, *Ctsl*, *Prss16*, *Cd83*, *H2-Aa*) (Figure 1.2, p.16)¹¹². Ces cellules apparaissent à partir du jour embryonnaire E14.5 et leur proportion augmente jusqu'à la naissance. Ces résultats suggèrent que les cTEC4 représentent le stade mature des cTEC (Figure 1.2, p.16)¹¹². Une autre étude récente utilisant le séquençage d'ARNm de cellules uniques a montré que la

signature génique des cTEC à quatre semaines d'âge différait des TEC embryonnaires (E14.5 et E18.5) et postnatales (6 jours), montrant que l'expression génique des cTEC diffère selon le stade de développement¹¹³.

Les mTEC, quant à elles, sont fréquemment décrites par leur capacité de liaison à UEA1 (*Ulex Europaeus Agglutinin I*), une lectine se fixant à un motif de glycosylation de type α -linked fucose. Les différentes sous-populations de mTEC sont caractérisées par l'expression de CD80, MHC-II, CCL21, L1CAM, Ly6d et du facteur de transcription *Aire* (voir Figure 1.2, p.16). Les mTEC les plus immatures, exprimant des niveaux faibles de MHC-II et de CD80,

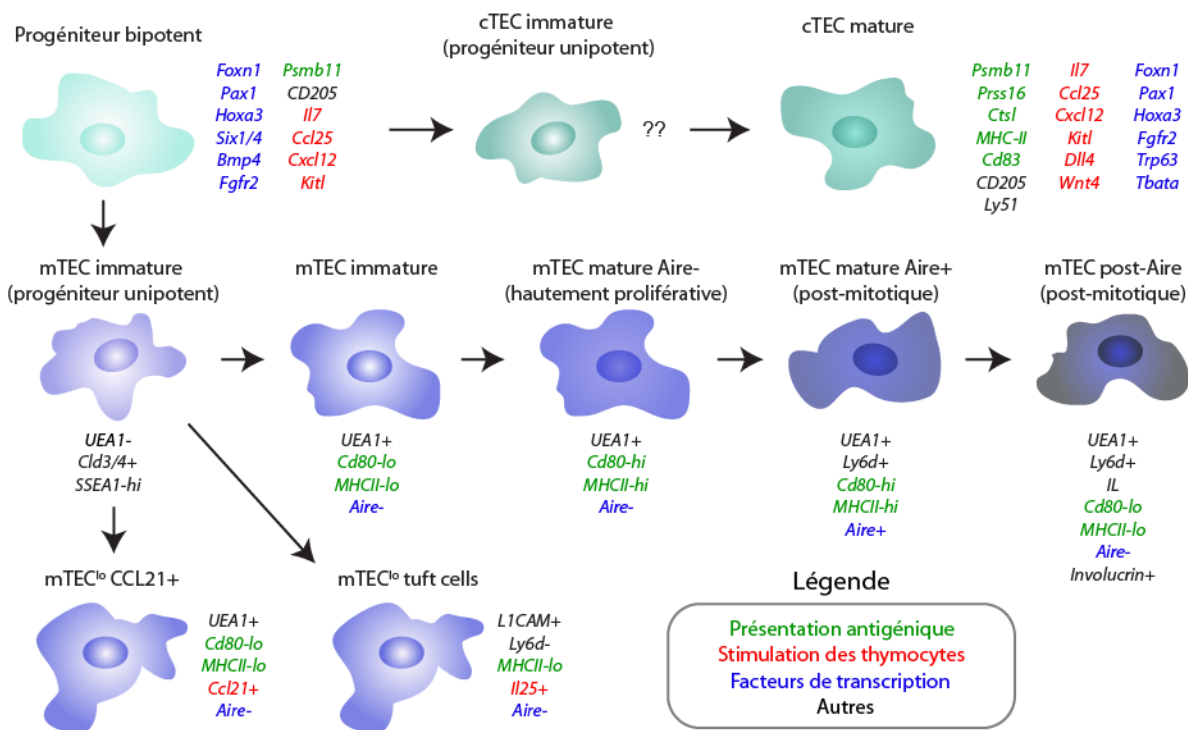


Figure 1.2 | Modèle proposé de différenciation des TEC

Modèle de différenciation des TEC et des gènes exprimés par chaque sous-population de TEC.

majoritaires dans le thymus adulte. Il a été montré que ces cellules contiennent des progéniteurs pouvant se différencier en mTEC matures^{114,115}, ou mTEC^{hi}, passant d'abord

par un stade hautement prolifératif associé à une forte expression de CD80 et de MHC-II (mTEC matures Aire-), avant d'exprimer le facteur de transcription *Aire* et de devenir post-mitotiques (mTEC matures Aire+)¹¹⁵. Ce sont ces cellules qui expriment les plus hauts niveaux d'expression ectopique de gènes tissus-spécifiques⁶². Il a également été montré que les mTEC^{hi} mature Aire+ pouvaient perdre progressivement l'expression de AIRE, de CD80 et MHC-II, pour redevenir mTEC^{lo}^{116,117}. Ces cellules, appelées post-Aire, sont caractérisées par une expression élevée de cytokératines et d'involucrine, un marqueur de différenciation terminale des kératinocytes¹¹⁶.

Les mTEC requièrent l'activation des voies canoniques et non canoniques de NF- κ B pour leur différenciation^{114,118,119}. Ces signaux sont apportés par différents types de cellules lymphoïdes qui expriment individuellement ou en combinaison les ligands CD40L, RANKL et LT α / β ⁸: (1) les thymocytes SP $\alpha\beta$ TCR+, (2) les cellules NKT invariantes exprimant CD1d, (3) les cellules T $\gamma\delta$ TCR+ et (4) les cellules lymphoïdes innées (*innate lymphoid cells*, ILC) ROR γ t+. La signalisation par LT α / β -LT β R semble plus importante pour la différenciation des mTEC^{lo} CCL21+¹²⁰, alors que la signalisation RANKL-RANK et CD40L-CD40 est essentielle à la différenciation des mTEC^{hi} Aire+¹²¹⁻¹²⁴. Cette stimulation réciproque entre les thymocytes et les mTEC est appelée *thymic crosstalk* et est essentielle à l'établissement de la tolérance au soi^{8,119}.

Enfin, de nouvelles sous-populations de mTEC ont été identifiées dans les dernières années. Une sous-population de mTEC^{lo} exprime la chimiokine CCL21, impliquée dans la migration des thymocytes SP vers la médulla suite à la sélection positive¹²⁰. Une autre, appelée *tuft epithelial cells*, a été identifiée grâce à l'analyse transcriptomique de cellules uniques dans le thymus postnatal. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de L1CAM, d'IL25 et leur différenciation dépend de l'expression des facteurs de transcription *Pou2f3* et *Hipk2*^{113,125}. Ces cellules expriment de faibles de niveaux de MHC-II, n'expriment pas *Aire*, mais expriment un ensemble de

gènes associés aux *tuft cells* de l'épithélium intestinal et sont nécessaires pour la sélection négative d'un sous-ensemble d'antigènes du soi¹²⁵.

Les TEC montrent donc une grande hétérogénéité, autant lors du développement embryonnaire que chez l'adulte¹²⁶. Les rôles connus spécifiques à chaque sous-population de TEC sont résumés dans la table 1.4 (p.18). Cependant, nous ignorons encore pour le moment l'importance et les rôles spécifiques de certaines sous-populations de TEC, et le degré d'hétérogénéité des cTEC chez l'adulte reste à déterminer.

Table 1.4 | Résumé des rôles connus des différents types de TEC

Cellules	Marqueurs phénotypiques	Rôles dans la thymopoïèse
cTEC	UEA1- Ly51+	<ul style="list-style-type: none"> • Régulation de l'import des précurseurs lymphoïdes dans le thymus et de la migration des thymocytes vers la région subcapsulaire du cortex • Régulation des étapes de développement des thymocytes DN • Sélection positive
Thymic nurse cells (cTEC) ¹²⁷	UEA1- Ly51+ pH91+	<ul style="list-style-type: none"> • Favorise la sélection positive pendant le réarrangement secondaire de la chaîne TCRα
mTEC ^{hi} Aire+	UEA1+ Ly51- MHC-II ^{hi} CD80 ^{hi} Ly6d+ Aire+	<ul style="list-style-type: none"> • Sélection négative • Expression ectopique de gènes tissus-spécifiques
mTEC <i>tuft cells</i>	UEA1+ Ly51- L1CAM+ Ly6d- MHC-II ^{lo} Il25+	<ul style="list-style-type: none"> • Sélection négative • Expression ectopique de gènes tissus-spécifiques
mTEC Ccl21+	UEA1+ MHC-II ^{lo} Ccl21+	<ul style="list-style-type: none"> • Migration des thymocytes sélectionnés positivement (SP) vers la médulla

1.4 L'involution thymique

L'importance de la fonction thymique peut être appréciée par les différentes conséquences d'une absence du thymus, ou d'une dérégulation de son fonctionnement. Une déficience de *Foxn1* et de *Tbx1* entraînent respectivement les syndrômes de Pignata-Guarino et de DiGeorge chez l'humain, tous deux caractérisés par une absence complète du thymus (athymie)^{8,128}. Comme le thymus est le seul organe permettant le développement des cellules T classiques, son absence résulte en une profonde immunodéficience. Une dérégulation de la fonction thymique, comme dans le cas d'une perte de fonction du gène *Aire*, entraîne une tolérance incomplète au soi, provoquant chez l'humain le syndrome auto-immun polyendocrinien de type I (*autoimmune polyendocrine syndrome type 1* ou APS-1), aussi appelé *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy* (APECED)¹²⁹. Ainsi, un dérèglement de la fonction thymique peut entraîner des conséquences graves à la santé et à la survie d'un individu.

Malgré son rôle crucial dans le système immunitaire, le thymus subit un processus de dégénérescence rapide avec l'âge, appelé involution thymique et caractérisé par une diminution rapide de la thymopoïèse^{74,130}. Cependant, les conséquences de l'involution thymique chez un individu sain sont plutôt limitées, grâce à l'établissement de la mémoire immunitaire. Trois hypothèses ont été postulées quant à la raison d'être de ce phénomène :

1. L'hypothèse métabolique : la demande énergétique requise serait trop élevée comparativement aux avantages apportés par le maintien d'une thymopoïèse élevée. Cette hypothèse est supportée par le fait que le thymus diminue sa production de lymphocytes T lors des périodes métaboliquement exigeantes, comme lors d'infections, de stress (physiologique ou psychologique) ou pendant la grossesse¹³¹ (voir sections 1.4.1 et 1.4.2).

2. L'hypothèse immunologique : la diminution de la production de cellules T permettrait de prévenir la génération de cellules T régulatrices contre des agents infectieux, de cellules T effectrices contre des antigènes foétaux ou du soi^{132,133}. De plus, la maintenance de la mémoire immunitaire pourrait être compromise par une thymopoïèse trop élevée. Cette hypothèse est supportée par l'étude de Gao et al (2014), démontrant qu'une thymopoïèse réduite favorise la préservation des cellules T CD4+ mémoires en périphérie¹³⁴.
3. L'hypothèse oncogénique : la diminution de la production de cellules T permettrait de réduire les risques de leucémie^{135,136}.

La perte de la fonction thymique peut cependant avoir de graves conséquences dans les situations où une thymopoïèse active est nécessaire afin de préserver l'immunocompétence¹³⁷. C'est le cas dans plusieurs scénarios cliniques, où le système hématopoïétique subit des dommages importants (chimiothérapie, radiothérapie, etc.)¹³⁸. Bien que le thymus possède une certaine capacité régénérative chez les jeunes adultes, permettant une reconstitution partielle des cellules T en périphérie, cette capacité régénérative est grandement diminuée, voire complètement perdue avec l'âge¹³⁹. Ainsi, la récupération immunitaire suite à un traitement de chimiothérapie peut prendre des années, voire ne jamais se produire pour les individus âgés, entraînant des risques importants d'infections opportunistes^{137,138,140}. Chez les patients recevant une greffe de moelle osseuse allogénique, dont le système hématopoïétique doit être entièrement éliminé, la fonction thymique est encore plus cruciale pour le rétablissement de l'immunité¹⁴¹.

On distingue deux types d'involution thymiques : chronique ou aiguë. L'involution chronique, ou involution liée à l'âge, est causée par de multiples facteurs et est (pour le moment) irréversible. À l'opposé, l'involution aiguë implique un stimulus spécifique menant à une involution rapide, mais réversible suite au retrait du stimulus.

Les différents phénomènes d'involution thymique se produisent selon deux mécanismes généraux : (1) par la régulation de la fonction des TEC ou (2) par l'induction directe de l'apoptose des thymocytes. Les prochaines sections résumeront l'état des connaissances actuelles sur les différents facteurs contribuant à l'involution thymique chronique ou aiguë.

1.4.1 Involution chronique : âge et hormones sexuelles

L'involution thymique avec l'âge est causée principalement par une diminution du nombre de thymocytes, ainsi que des changements dans l'épithélium thymique :

1. Diminution du nombre de TEC¹⁴²⁻¹⁴⁴;
2. Augmentation du ratio de cTEC/mTEC¹⁴²;
3. Diminution de l'expression de gènes essentiels à la thymopoïèse (e.g. *Foxn1*, *Ccl25*)^{99,101} ou au maintien de l'épithélium (e.g. *Fgf21*)¹⁴⁵;
4. Diminution de la prolifération des TEC¹⁴²;
5. Remplacement du tissu épithélial par du tissu adipeux (particulièrement chez l'humain)^{10,143,146}.

Malgré cette détérioration du stroma thymique, le thymus reste fonctionnel : la cellularité du thymus est grandement réduite, mais les proportions des sous-populations de thymocytes restent normales¹⁴², montrant seulement une accumulation relative des thymocytes DN1¹⁴⁷.

L'involution thymique débute très tôt, dès 5 semaines chez la souris, et son rythme s'accélère à la puberté, provoqué par l'augmentation des niveaux d'hormones sexuelles¹⁴⁸. Alors que l'ablation des hormones sexuelles mâles et femelles induit une hypertrophie thymique, l'augmentation des niveaux d'hormones sexuelles provoque l'involution du thymus^{147,149-151}. La régulation de la fonction thymique par les hormones

sexuelles agit à travers les TEC en régulant l'expression de gènes essentiels à la thymopoïèse (*Foxn1*, *Dll4*, *Ccl25*)^{101,149,152-155}, régulant la différenciation et la prolifération des thymocytes DN^{149,150}. Cependant, l'involution liée à l'âge ne semble pas être seulement causée par les hormones sexuelles. En effet, l'hypertrophie thymique induite par la castration est seulement transitoire : deux mois après la chirurgie, le thymus retrouve une activité similaire aux mâles non-castrés du même âge, malgré l'absence d'androgènes^{156,157}. De plus, le thymus continue d'involuer chez les individus âgés, dont les taux d'hormones sexuelles sont en déclin^{156,158}. Ces résultats suggèrent l'existence d'autres facteurs impliqués dans l'involution thymique liée à l'âge.

1.4.2 Involution aiguë : Métabolisme, infection et autres facteurs de risques

1.4.2.1 Infections et glucocorticoïdes

Suivant un stress important, tel qu'une infection, le thymus subit une atrophie importante. Cette involution aiguë vise sans doute à préserver les ressources énergétiques pour la réponse immunitaire et/ou prévenir le développement de cellules T régulatrices contre le pathogène à combattre. Les interactions réciproques (*crosstalk*) étant nécessaires à la survie, à la prolifération et au développement des TEC et des thymocytes, il est souvent difficile de distinguer l'involution thymique régulée par les TEC de celle provoquée par l'apoptose des thymocytes. En effet, pendant l'involution survenant lors d'une infection, les deux mécanismes interviennent en parallèle : (1) une involution rapide régulée par les TEC grâce à la détection de signaux infectieux, (2) suivie de l'apoptose des thymocytes induite par des signaux inflammatoires produits lors de la réponse immunitaire¹³². La capacité du thymus à réduire rapidement sa production de cellules T lors d'une infection dépend de la reconnaissance de motifs associés aux pathogènes¹³². Les TEC peuvent par exemple détecter l'ARN double brin (une structure

spécifique à certain virus) grâce aux gènes MDA5, menant à la production d'IFN-1¹⁵⁹. Les TEC répondent à la présence d'interféron- α par une diminution de leur fonctionnalité, menant à une réduction de la thymopoïèse dans les jours suivants¹⁶⁰. En parallèle, la réponse immune en périphérie induit une augmentation des niveaux de glucocorticoïdes dans le sang, provoquant l'apoptose massive des thymocytes^{161,162}, qui expriment le récepteur des glucocorticoïdes¹⁶³⁻¹⁶⁷. Plusieurs autres types de stress (psychologique, physiologique) induisent la sécrétion des glucocorticoïdes, provoquant aussi une involution thymique aiguë, qui peut être prévenue par l'ablation des glandes surrénales^{165,166,168}.

1.4.2.2 Leptine et restriction calorique

L'état du thymus est directement lié à l'état métabolique de l'individu. La restriction calorique mène à une réduction de l'involution thymique avec l'âge, en réduisant l'accumulation de tissus adipeux dans le thymus¹⁴³. Comme les adipocytes sécrètent plusieurs cytokines, hormones et autres métabolites pro-inflammatoires (LIF, OSM, IL6), il est probable que leur présence dans le thymus aggrave l'involution reliée à l'âge^{132,146}. Cependant, une restriction calorique trop sévère (jeûne ou famine) induit une atrophie thymique, démontrant l'importance d'un équilibre métabolique dans la fonction immunitaire¹⁶⁹. De plus, les souris obèses possédant des mutations dans le gène de la leptine (*ob/ob*) ou du récepteur de leptine (*db/db*) montrent une dégénérescence accrue des TEC^{146,169}. À l'inverse, des souris *ob/ob* recevant une injection de leptine montrent une thymopoïèse accrue, et des niveaux élevés de leptine ont un effet protecteur contre l'involution induite par l'injection de lipopolysaccharide (LPS)¹⁶¹.

1.4.2.3 Radiations et agents oxydants

Les irradiations affectent particulièrement les cellules en prolifération active. De ce fait, les cellules hématopoïétiques sont particulièrement affectées par une exposition

aux radiations, par exemple lors d'une radiothérapie. Dans le thymus, toutes les populations de thymocytes sont affectées, bien que les thymocytes DP soient particulièrement sensibles à l'irradiation¹⁷⁰. Les TEC subissent également des dommages, principalement une diminution du nombre de mTEC MHC-II^{hi} Aire⁺¹⁷¹⁻¹⁷³. Enfin, les TEC sont particulièrement sensibles aux dommages induits par les agents oxydants (e.g. radicaux libres). En effet, les TEC expriment des niveaux bas de catalase, une enzyme métabolisant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), et l'administration d'antioxydants atténue l'atrophie thymique avec l'âge¹⁷⁴.

1.4.3 Immunosénescence VS sénescence cellulaire

Lorsqu'on parle de vieillissement, on fait souvent référence à l'augmentation de la sénescence cellulaire dans les tissus¹⁷⁵. La sénescence cellulaire a tout d'abord été décrite comme l'arrêt de réplication causé par un épuisement des cellules en culture, menant à un arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G0-G1. La sénescence répliquative est causée par un raccourcissement des télomères ou encore en réponse à différents stress (stress oxydatif ou signaux mitogènes excessifs)¹⁷⁶. *In vivo*, la sénescence joue différents rôles, dont le plus important semble être la prévention du cancer¹⁷⁷. Par exemple, de forts signaux oncogéniques (e.g. Ras), ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (e.g. p53 ou p14ARF/p16INK4A) induisent la sénescence cellulaire¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. De plus, les tissus montrant des lésions néoplasiques montrent systématiquement une augmentation de la sénescence¹⁷⁵. Cependant, la présence de cellules sénescents dans les tissus entraîne certains problèmes liés à leur phénotype sécrétoire (*senescence-associated secretory phenotype*, SASP). En effet, les cellules sénescents sécrètent des protéases, cytokines et facteurs de croissance qui jouent un rôle dans la réparation tissulaire¹⁷⁹, mais peuvent également induire un stress supplémentaire sur les cellules saines environnantes¹⁷⁶. La sénescence cellulaire représente donc une forme de « mort cellulaire préventive » pour

les cellules prolifératives, bénéfique chez les jeunes individus, mais néfaste chez les individus plus âgés¹⁸⁰.

La sénescence cellulaire de l'épithélium thymique ne semble pas être la cause première de l'involution avec l'âge, qui débute dès la pré-adolescence. Le thymus montre une importante capacité régénérative menant à une prolifération accrue des TEC en jeune âge, démontrant que celles-ci ne sont pas sénescents^{171,181}. Toutefois, la diminution de la capacité régénérative du thymus avec l'âge pourrait être causée par l'épuisement des cellules progénitrices de l'épithélium thymique. Plusieurs études ont rapporté que le potentiel clonogénique des TEC diminuait rapidement avec l'âge, mais seulement en présence de thymopoïèse complète^{86,182,183}. Le thymus est également l'organe contenant le plus grand nombre de cellules apoptotiques, puisque >95% des thymocytes produits mourront par négligence ou par sélection négative pendant leur développement^{184,185}. Cela pourrait constituer un stress non négligeable pour les TEC, puisque les thymocytes mourants relâchent des molécules oxydatives (*reactive oxygen species*) et du TGF- β , qui sont connus pour inhiber la prolifération et la différenciation des TEC^{186,187}.

L'immunosénescence fait référence aux multiples changements se produisant dans le système immunitaire avec le vieillissement, mais n'est pas limitée à la sénescence cellulaire. On décrit généralement l'immunosénescence comme une détérioration progressive des réponses immunitaires avec l'âge, caractérisées par une augmentation de l'immunité innée au détriment de l'immunité adaptative¹⁸⁸ et une susceptibilité croissante aux maladies infectieuses, cancers et maladies auto-immunes¹⁸⁹. Le vieillissement affecte particulièrement les cellules T, qui montrent une fonction cytotoxique et une prolifération diminuées¹⁹⁰, une tendance vers la production de cytokines de type Th2 (pro-inflammatoire)¹⁹¹ et une réduction dans la diversité du répertoire des cellules T CD4+ et CD8+^{192,193}. Des cellules T inactives (CD28-) s'accumulent également, montrant des signes de sénescence cellulaire : télomères courts, potentiel prolifératif limité, production de

TNF- α et IL6 (associés au SASP), et résistance à l'apoptose^{194,195}. Un des marqueurs les plus évidents de l'immunosénescence est bien sûr l'involution thymique, discutée plus haut, et la diminution du nombre de cellules T naïves qui l'accompagne¹⁸⁸. Comme la production de cellules T naïves diminue avec l'âge, il se produit une expansion clonale des cellules T en périphérie (i.e. hors du thymus) et la diversité du répertoire des TCR diminue¹⁹⁶. De plus, les cellules T naïves nouvellement produites possèdent une capacité réduite à proliférer suite à une stimulation antigénique et sous-expriment les récepteurs impliqués dans la résidence des cellules dans les tissus lymphoïdes secondaires (*homing*) tels que CD62L et CCR7, interférant avec leur mobilisation aux sites d'infection¹⁹⁷. Enfin, la sélection négative par le thymus semble perturbée suite à la perte des mTEC et cellules dendritiques du thymus, menant à une plus grande susceptibilité aux maladies auto-immunes^{198,199}.

Plusieurs autres facettes de l'immunité sont également affectées lors du vieillissement : une réponse humorale (cellules B) affaiblie¹⁹⁰, une diminution du nombre de cellules dendritiques²⁰⁰, une augmentation du nombre de cellules NK mais une diminution de leur fonction cytotoxique^{201,202}. Enfin, le vieillissement induit un état d'inflammation chronique, associé à des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL6), de protéines de phase-aiguë (protéine C réactive, CRP) et de récepteurs solubles de l'IL2 (sIL2R)²⁰³, qui pourraient être à l'origine de maladies associées au vieillissement (Alzheimer, athérosclérose, cancer, etc.)^{188,204}.

1.5 La régénération thymique

Au cours des dernières décennies, plusieurs travaux de recherche ont été entrepris afin de mieux comprendre les mécanismes permettant la régénération thymique, ainsi que de développer des stratégies permettant d'augmenter les niveaux de thymopoïèse.

1.5.1 *Foxn1* et autres gènes importants dans la thymopoïèse

L'expression de *Foxn1* par les TEC est directement reliée à leur fonction. En effet, plusieurs gènes régulés par *Foxn1* sont essentiels à la thymopoïèse, tels que *Ccl25*, *Dll4*, *Cxcl12*, *Psm11*, *Cd83* et *Prss16*¹⁰⁰. L'expression déclinante de *Foxn1* avec l'âge est considérée comme la cause première de l'involution thymique avec l'âge²⁰⁵. Chez l'humain, les niveaux moyens d'expression de *Foxn1* diminuent de façon modérée chez l'adolescent (7-17 ans) et de façon plus prononcée chez l'adulte (49 à 78 ans) comparativement aux nouveaux-nés²⁰⁶. Chez la souris, la proportion de TEC FOXN1+ diminue graduellement avec l'âge (de 99.7% chez l'embryon, à 66.8% à 1 an et 62.9% à 2 ans)²⁰⁷. Les facteurs entraînant la diminution de l'expression de *Foxn1* sont encore méconnus, mais de multiples facteurs semblent être en cause. Bien que les hormones sexuelles (androgènes, estrogènes et progestérones) affectent les taux de production de cellules T, l'injection de testostérone n'induit pas de diminution de l'expression de *Foxn1*, mais plutôt induit une diminution de l'expression de *Dll4*, un autre gène central à la thymopoïèse¹⁵³. Nous ignorons encore si les hormones sexuelles féminines ont un effet direct sur l'expression de *Foxn1*. De plus, bien qu'une ablation des hormones sexuelles mène à une hypertrophie thymique, celle-ci est seulement transitoire, et le thymus retrouve un phénotype normal selon l'âge dans les mois suivants l'ablation¹⁵⁶. Basé sur ces évidences, et sur le fait que les niveaux d'hormones sexuelles diminuent avec l'âge, il semble improbable que la diminution de l'expression de *Foxn1* soit causée par les hormones sexuelles. Ainsi à ce jour, le mécanisme causant la diminution de l'expression

de *Foxn1* reste encore inconnu. Cependant, une surexpression forcée de *Foxn1* mène à une restauration de la thymopoïèse, mesurée par l'augmentation de la cellularité du thymus et de la production de cellules T naïves²⁰⁸. L'épithélium thymique retrouve également une apparence « jeune », caractérisée par une augmentation des proportions des cellules MHC-II^{hi} dans les TEC, de la prolifération des TEC, de l'expression ectopique de gènes tissus-spécifiques et du ratio mTEC/cTEC²⁰⁸. D'ailleurs, l'expression forcée de *Foxn1* dans des fibroblastes est suffisante pour induire leur reprogrammation en cellules épithéliales thymiques fonctionnelles, permettant le développement des cellules T *in vitro* et *in vivo*²⁰⁹.

En absence de *Foxn1*, quatre molécules de stimulation ont été montrées comme essentielles à l'établissement d'un microenvironnement permettant la différenciation des cellules T : *Dll4*, *Cxcl12*, *Kitl* et *Ccl25*¹¹. En effet, la réexpression de ces quatre gènes permet la différenciation des précurseurs lymphoïdes vers la lignée T, jusqu'au stade double positif (DP) dans le thymus embryonnaire. Cependant, d'autres molécules essentielles à la sélection positive des thymocytes et régulées par *Foxn1* (e.g. MHC-II, *Prss16*, etc.) sont également nécessaires pour le développement des thymocytes au-delà du stade DP¹¹, soulignant l'importance de *Foxn1* dans le processus complet de thymopoïèse. La table 1.5 (p.28) décrit les différentes cytokines impliquées dans le développement des thymocytes ainsi que leurs rôles respectifs.

Table 1.5 | Cytokines impliquées dans la thymopoïèse

Gènes	Rôles
<i>Cxcl12</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Extravasation des précurseurs et entrée dans le thymus, • <i>Homing</i> et survie des thymocytes • Migration vers le cortex
<i>Ccl25</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Extravasation des précurseurs et entrée dans le thymus, • <i>Homing</i> et survie des thymocytes • Migration vers le cortex
<i>Kitl</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Survie et prolifération des thymocytes
<i>Il7</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Survie et prolifération des thymocytes
<i>Hhg</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Survie et prolifération des thymocytes
<i>Ccl17/19/21</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Migration des thymocytes vers la médulla suite à la sélection positive

1.5.2 Blocage de la signalisation par les hormones stéroïdiennes

Les agonistes de LHRH (*Luteinising Hormone Releasing Hormone*) mènent à une désensibilisation des récepteurs de LHRH, menant à l'inhibition de la sécrétion de LH (*luteinizing hormone*) et de FSH (*follicle stimulating hormone*), résultant en une production d'hormones sexuelles diminuées⁷⁴. Il a été montré récemment que l'utilisation d'agonistes de la LHRH suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques induit une augmentation de la production de cellules T naïves par le thymus, résultant en l'augmentation de la diversité du répertoire de cellules T en périphérie et favorisant la reconstitution des cellules T²¹⁰⁻²¹². En effet, le blocage des hormones sexuelles induit la production de cellules lymphoïdes par la moelle osseuse^{213,214}, en plus de favoriser directement l'expression de facteurs impliqués dans la régénération thymique (*Ccl25*, *Dll4* et *Vegf*)^{153,215-217}.

1.5.3 Facteurs de croissance et TGF- β

KGF (*keratinocyte growth factor*) est un facteur de croissance sécrété par les cellules mésenchymateuses favorisant la prolifération des cellules épithéliales environnantes par un effet paracrine²¹⁸. Bien que l'absence de KGF ne perturbe pas la thymopoïèse en conditions physiologiques, la reconstitution des cellules T suite à une irradiation et une transplantation de moelle osseuse est grandement diminuée chez les souris génétiquement modifiées portant une mutation d'inactivation (*knockout*) pour KGF^{219,220}. KGF agit principalement sur les TEC, qui expriment son récepteur FGFR2-IIIb, stimulant leur prolifération, différenciation et production de cytokines impliquées dans la thymopoïèse^{91,221,222}.

L'hormone de croissance (GH, *growth hormone*) et l'IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) favorisent elles aussi la thymopoïèse par stimulation des TEC^{74,221,223}. Des injections répétées de GH et de IGF-1 permettent de renverser l'involution thymique liée à

l'âge^{224,225}, et facilitent la régénération thymique et la reconstitution des cellules T suite à une transplantation de moelle osseuse chez des sujets âgés²²⁶ ou chez des patients atteints du VIH²²⁷. Enfin, le blocage de la signalisation par TGF- β favorise la survie et la prolifération des TEC suite à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques^{187,228}.

1.5.4 Interleukines (IL) 7, IL21 et IL22

L'IL7 dans le thymus est principalement produite par une sous-population de cTEC, co-exprimant *Dll4*, *Ccl25*, *Ctsl*, *Psm11* et *Prss16*⁸⁰. L'IL7 favorise la prolifération, la survie et la différenciation des thymocytes pendant leur développement^{229,230}. Des études ont démontrées que l'injection d'IL7 peut augmenter la production de cellules T naïves par le thymus, en plus de favoriser la prolifération homéostatique des cellules T matures en périphérie^{231,232}. Cependant, dans le contexte d'une greffe de moelle osseuse, l'injection d'IL7 peut mener à une intensification de la maladie du greffon contre l'hôte (*graft versus host disease*)²³³.

Pendant la régénération thymique suivant une irradiation sub-létale, la déplétion des thymocytes DP induit l'expression d'IL23 par les cellules dendritiques, qui induit à son tour la production d'IL22 par les cellules lymphoïdes innées (ILC)²³⁴. L'IL22 favorise la prolifération et la survie des TEC, menant à la régénération thymique²³⁴. En outre, une étude subséquente a montré une corrélation entre l'expression de *Foxn1* et *d'Il22* suite à la déplétion des thymocytes DP par irradiation²³⁵. Finalement, l'injection d'IL21 peut accélérer significativement la régénération thymique suite à une déplétion des thymocytes DP induite par les glucocorticoïdes ou suite à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques^{167,236}.

1.5.5 Thérapies cellulaires

La thérapie cellulaire consiste en l'utilisation de cellules vivantes, plutôt que de molécules, pour soigner une condition spécifique. Dans le cadre de la régénération thymique, la thérapie cellulaire semble particulièrement intéressante puisqu'elle pourrait permettre de remplacer complètement un thymus pour repartir à neuf lorsqu'il est endommagé, involué ou déficient. Par exemple, pour les individus atteints du syndrome de DiGeorge chez qui le développement du thymus est perturbé, il faut recréer un stroma thymique à partir de cellules souches.

Des études récentes ont développé une méthode permettant d'induire des cellules souches embryonnaires à se différencier en cellules progénitrices des TEC. Cela implique une différenciation progressive, d'abord vers l'endoderme par des facteurs tels que l'Activin A ou Wnt3a, puis vers les TEC par une combinaison de différents stimuli (Fgf, BMP4, acide rétinoïque et Egf)²³⁷. Ces travaux, d'abord effectués chez la souris, ont été depuis reproduits à partir de cellules embryonnaires souches humaines²³⁸⁻²⁴⁰. Des travaux similaires ont également été effectués à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs). La différenciation des iPSCs vers les TEC nécessite d'abord une stimulation par Activin A et chlorure de lithium, suivi d'une stimulation par FGF-7/8/10 et BMP4²⁴¹. La différenciation subséquente des progéniteurs de TEC vers les mTEC dépend d'une stimulation par RANKL²⁴¹.

Pour recréer un microenvironnement capable de soutenir la thymopoïèse à partir de TEC, il faut utiliser un système de culture tridimensionnelle. En effet, dans un système de culture en deux dimensions (2D), les TEC perdent l'expression de plusieurs gènes essentiels à la thymopoïèse, dont *Foxn1* et *Aire*²⁴²⁻²⁴⁴, et expriment des marqueurs de différenciation des cellules épidermiques²⁴⁴. À l'inverse, l'utilisation d'un système de culture 3D permet le maintien de l'identité cellulaire des TEC²⁴⁵ et le développement des cellules T à partir de précurseurs hématopoïétiques^{245,246}. Plus récemment, l'utilisation de

structure matricielle décellularisée a permis la reconstitution d'un thymus fonctionnel à partir de cellules stromales thymiques et de cellules progénitrices de la moelle osseuse, générant un organe viable supportant la génération de cellules T *in vitro* et *in vivo*²⁴⁷. La décellularisation est obtenue par la perfusion de l'organe avec un détergent permettant de retirer toutes les composantes cellulaires tout en préservant la matrice extracellulaire, facilitant la repopulation de la structure tridimensionnelle par de nouvelles cellules. D'ailleurs, la reconstitution d'un thymus par l'utilisation combinée de TEC originant d'un donneur allogénique et du receveur a permis d'établir la tolérance à une greffe de peau allogénique du même donneur²⁴⁷.

Une étude récente chez la souris a démontré que la sécrétion de BMP4 par les cellules endothéliales du thymus favorisait la régénération thymique suite à une involution aiguë induite par irradiation sub-létale²⁴⁸. BMP4 agit sur les TEC en induisant l'expression de *Foxn1* et de ces cibles. Les auteurs ont également montré que l'injection de cellules endothéliales thymiques cultivées *ex vivo* accélère la régénération thymique²⁴⁸. L'effet des cellules endothéliales sur la régénération thymique était tissu-spécifique, puisque l'injection de cellules endothéliales originant du cœur ou du rein n'améliorait pas la régénération thymique²⁴⁸. Les cellules endothéliales cultivées *ex vivo* sont transformées par un gène adénoviral (*E4ORF1*) permettant l'activation constitutive de la voie Akt²⁴⁹. Elles peuvent être maintenues en culture sans perdre leur phénotype ou leur capacité de vascularisation et peuvent être injectées *in vivo* pour favoriser la création de nouvelles structures vasculaires sans générer de tumeurs²⁴⁹.

Enfin, lors d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques, l'ajout de cellules pré-T produites *in vitro* (de phénotype DN2 et DN3 principalement) à la greffe permet d'augmenter la colonisation du thymus par les cellules du donneur, favorisant ainsi la reconstitution immunitaire chez le receveur²⁵⁰. Le développement de thérapies cellulaires basées sur ces découvertes aura très probablement d'importantes retombées

cliniques, tant pour les patients recevant une greffe d'organe ou de moelle osseuse, que les patients atteints d'immunodéficience ou de maladies auto-immunes.

1.6 Présentation des chapitres

Le système immunitaire présente un dimorphisme sexuel important. En effet, les femelles présentent généralement des réponses immunitaires plus fortes face aux infections ou à la vaccination, mais souffrent davantage de maladies auto-immunes²⁵¹⁻²⁵⁴. Les mécanismes derrière ce dimorphisme sexuel sont encore peu connus, mais plusieurs évidences montrent que les hormones sexuelles peuvent agir directement et indirectement sur les cellules immunitaires. Nous avons donc voulu déterminer l'impact des hormones sexuelles sur les TEC, puisqu'elles sont responsables de la régulation du développement et de la sélection des cellules T (chapitre 2). Dans cet article, nous démontrons que les cTEC sont particulièrement affectées par les hormones sexuelles. Chez les mâles, la présence d'androgènes induit une diminution de la prolifération, de l'expression de *Foxn1* et de ces cibles principales chez les cTEC, ainsi que de l'expression de l'expression ectopique de gènes tissus-spécifiques chez les mTEC.

Dans un précédent projet effectué pendant ma maîtrise, nous avons identifié une population de cTEC quiescentes dans le thymus adulte¹⁸¹. Nous avons donc voulu déterminer la contribution de ces cTEC quiescentes à la régénération thymique suivant une involution aiguë induite par irradiation sub-létale (chapitre 3). Alors que les mTEC UEA1+ prolifèrent le plus en conditions normales, elles sont particulièrement affectées par les radiations, qui provoquent l'arrêt de leur prolifération et une perte cellulaire significative dans cette population. À l'opposé, les cTEC quiescentes sont radio-résistantes et augmentent leur prolifération pendant les premiers jours de régénération thymique. Ces cellules possèdent une proportion élevée de cellules possédant un

phénotype non différencié, caractérisées par la co-expression des cytokératines K5 et K8 et une localisation près de la jonction cortico-médullaire du thymus.

Enfin, le chapitre 4 présente notre étude sur la cinétique des changements phénotypiques et transcriptomiques se produisant dans le thymus pendant un phénomène de régénération thymique endogène, la régénération postpartum. Pendant la grossesse, le thymus perd 70 à 80% de sa cellularité dans un processus régulé par les hormones sexuelles, puis retrouve graduellement sa cellularité normale dans les semaines suivant l'accouchement^{149,150}. Nous avons étudié les différentes populations cellulaires du thymus pendant et après la grossesse dans le but d'identifier les facteurs essentiels à la régénération thymique postpartum (chapitre 4). Étonnamment, malgré une diminution de 70% de la masse du thymus, aucune perte de cellules dans l'épithélium thymique ne survient pendant la gestation. De plus, le déclenchement de la régénération thymique postpartum ne nécessite pas l'expansion cellulaire de l'épithélium thymique, mais implique plutôt d'important changements phénotypiques chez les cTEC, entre autres la surexpression de *Foxn1* et de ces cibles. Enfin, nos résultats suggèrent que *Klf4* pourrait agir comme modulateur de la croissance thymique à titre d'effecteur de la signalisation hormonale.

Chapitre 2 - Étude intégrative de l'impact des hormones sexuelles sur les cellules épithéliales thymiques

2.1 Résumé

Le but de notre étude était d'évaluer l'effet systémique des hormones sexuelles sur les TEC. Pour ce faire, nous avons séquencé le transcriptome des cTEC et mTEC de souris de 6 mois de trois groupes différents : mâles, femelles et mâles castrés en jeune âge, à 4 semaines. En parallèle, nous avons caractérisé les différentes populations de TEC chez les trois groupes expérimentaux entre les âges de 1 à 12 mois. Nos résultats démontrent un impact général important sur le transcriptome des TEC, spécifique à chaque sous-population. Le dimorphisme sexuel était particulièrement visible chez les cTEC. En effet, les cTEC des mâles montrent des taux de prolifération beaucoup plus bas que les autres groupes expérimentaux. La prolifération des cTEC dans les différents groupes expérimentaux corrèlent avec l'expression de *Foxn1* et de ses cibles principales. De plus, les cTEC mâles expriment des niveaux relativement bas de gènes impliqués dans le développement des thymocytes (e.g. *Dll4*, *Ccl25*) et la sélection positive (*Psmb11* and *Ctsl*). Malgré cela, les cTEC sont retrouvées en plus grand nombre chez les mâles, corrélant avec une sur-expression des gènes régulant la survie cellulaire chez les cTEC et une sous-expression des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire chez les mTEC. Ces évidences suggèrent que l'influence des hormones sexuelles sur les TEC pourraient jouer un rôle dans l'établissement du dimorphisme sexuel dans la susceptibilité aux infections et aux maladies autoimmunes.

2.2 Contributions

J'ai effectué la majeure partie des expériences et analyses, avec l'aide de Charles Saint-Pierre. J'ai effectué le design expérimental et l'écriture du manuscrit conjointement avec Claude Perreault. Tous les auteurs ont discuté des résultats et révisé le manuscrit.

2.3 Référence de publication

Dumont-Lagacé, Maude, Charles St-Pierre, and Claude Perreault. "Sex hormones have pervasive effects on thymic epithelial cells." *Scientific reports* (2015); 5: 12895.

2.4. Article

Sex hormones have pervasive effects on thymic epithelial cells

Maude Dumont-Lagacé^{1,2} Charles St-Pierre^{1,2} and Claude Perreault^{1,2}

Keywords: Gene expression, Hormone receptor, Immunology, Physiology,
Systems biology

¹Institute for Research in Immunology and Cancer,

²Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3C

3J7

2.4.1 Abstract

The goal of our study was to evaluate at the systems-level, the effect of sex hormones on thymic epithelial cells (TECs). To this end, we sequenced the transcriptome of cortical and medullary TECs (cTECs and mTECs) from three groups of 6 month-old mice: males, females and males castrated at four weeks of age. In parallel, we analyzed variations in the size of TEC subsets in those three groups between 1 and 12 months of age. We report that sex hormones have pervasive effects on the transcriptome of TECs. These effects were exquisitely TEC-subset specific. Sexual dimorphism was particularly conspicuous in cTECs. Male cTECs displayed low proliferation rates that correlated with low expression of *Foxn1* and its main targets. Furthermore, male cTECs expressed relatively low levels of genes instrumental in thymocyte expansion (e.g., *Dll4*) and positive selection (*Psb11* and *Ctsl*). Nevertheless, cTECs were more abundant in males than females. Accumulation of cTECs in males correlated with differential expression of genes regulating cell survival in cTECs and cell differentiation in mTECs. The sexual dimorphism of TECs highlighted here may be mechanistically linked to the well-recognized sex differences in susceptibility to infections and autoimmune diseases.

2.4.2 Introduction

The immune system of vertebrates shows a major sexual dimorphism. Thus, relative to males, females usually display stronger immune response to vaccination and infection but suffer a higher propensity to many autoimmune diseases^{251–254}. Though we have limited insight into the mechanistic bases for these differences²⁵⁴, evidence suggests that they result from both direct and indirect effects of sex steroids on innate and adaptive immune responses. Thus, sex hormones can affect immune cells directly or via modulation of the gut microbiome which in turn influences the immune response^{255–259}. Sex-based differences in thymus biology have been observed in many studies. Thymic involution, which affects all vertebrates^{260,261}, accelerates at puberty and progresses at different rates in males and females^{129,154,262}. Also, administration and ablation of androgens respectively accelerates and reverses, albeit transiently, thymic involution^{132,147,152,156,263}. Nevertheless, it remains unclear to what degree sex steroids' impact on thymic cellularity may reflect the influence of hormones on thymic epithelial cells (TECs)²⁵³ vs. other cell types (thymocytes, mesenchymal cells).

Recent studies have shown that sex steroids do affect TECs. In adult mice, cortical and medullary TECs (cTECs and mTECs) have slower proliferation rates in males than females¹⁸¹. Furthermore, following acute ablation in a transgenic mouse model, cTECs were found to regenerate in females and castrated (Cx) males, but not in males or androgen-treated females²⁶⁴. Finally, it was recently shown that, in TECs, androgens repress transcription of the Notch ligand *Dll4*¹⁵³ which is essential for specification, commitment, and development of thymocytes²⁶⁵. Nevertheless, studies in other cell types (e.g., liver, adipose tissue, muscle, and brain) have shown that the effects of sex hormones are pleiotropic and exquisitely cell-type dependent^{266,267}. Hence, the impact of sex hormones on TECs cannot be inferred from data obtained in other cell types. The main goal of our study was therefore to evaluate at the systems-level, the effect of sex hormones

on TEC subsets. To this end, we sequenced the transcriptome of cTECs and mTECs from three groups of 6 month-old mice: males, females and males castrated at four weeks of age. In parallel, we analyzed variations in the size of TEC subsets in those three groups between 1 and 12 months of age. We report that sex hormones have pervasive effects on TEC biology. In particular, adult males accumulate more cTECs than females, but male cTECs display low proliferation rates and show evidence of functional impairment. Furthermore, both male and female sex hormones decrease promiscuous gene expression in mTECs.

2.4.3 Results

2.4.3.1 Dynamics of TEC populations as a function of age.

We expected that, in addition to divergent effects, sex hormones would have some redundant effects on TECs. Therefore, to get a global picture of these effects, we analyzed not only male and female mice but also Cx male mice. The onset of male puberty in inbred laboratory mice usually occurs between 34 and 38 days after birth²⁶⁸. Hence, in order to prevent any exposure to high levels of androgens, surgery in Cx males was performed before puberty, at one month of age (see Supplementary Figure S1.1a for experimental design, Annex I, p. ii). Also, knowing that castration induces a transient thymic hypertrophy¹⁵⁶, Cx males were not studied in the early weeks following surgery; they were analyzed before surgery (1 month-old) and at 3-12 months of age.

Total thymic cellularity, which essentially reflects thymocyte numbers, was similar in the three experimental groups over time (Figure 2.1A, left, p.42). Only a minimal and transient hypercellularity was observed at three months in Cx males, probably reflective of the ephemeral thymic rebound induced by castration¹⁵⁶. In adult mice, about 80% of TECs are mTECs and 20% cTECs^{142,181}. Notably, at 6 and 12 months, males possessed higher numbers of TECs than females and Cx males (Figure 2.1A, middle left, p.42). This discrepancy was due solely to the greater abundance of cTECs in males, which represented around 30 to 40% of TECs, from 3 to 12 months of age (Figure 2.1A middle right and 2.1B, p.42). In contrast, the loss of mTECs with age was similar in the three experimental groups (Figure 2.1A, right, p.42). In order to understand the

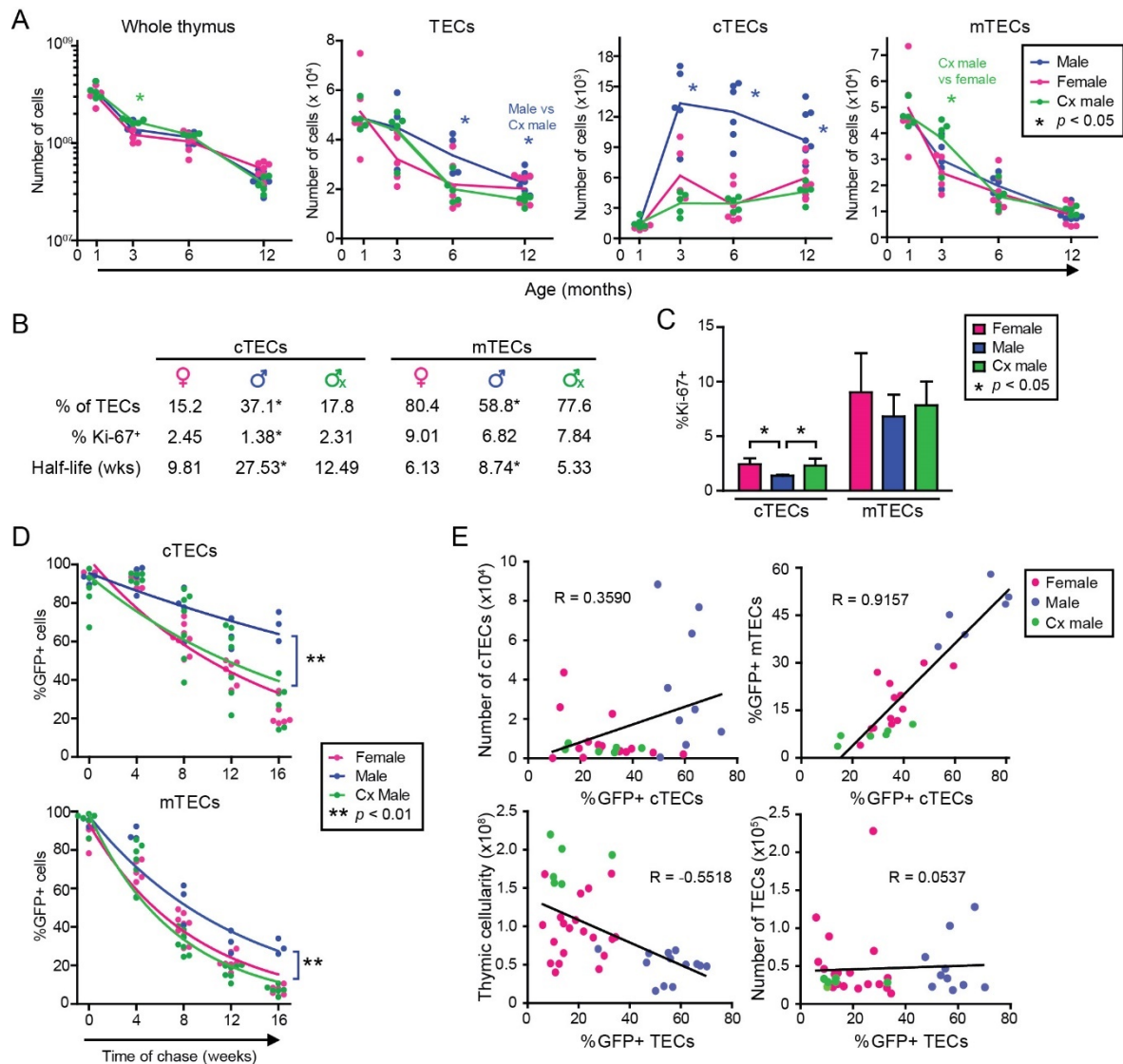


Figure 2.1 | Male mice show an accumulation of cTECs with age that is not due to enhanced cell proliferation

(A) Thymic cell populations in mice aged from 1 to 12 months. The gating strategy is depicted in Supplementary Figure S1.1C (Annex I, p. ii). (B) Percentage of TEC populations in 6 month-old mice, mean percentage of Ki-67⁺ cells at 4-5 months of age, and half-life (in weeks) of H2B-GFP⁺ TECs calculated using one phase decay nonlinear regression. (C) Percentages of Ki-67⁺ TECs in 4 to 5 month-old mice. (D) H2B-GFP dilution in adult mice during a chase period of 16 weeks. (E) Correlation (Pearson) between different features of TEC populations in 6 month-old mice. Each dot represents one individual.

dramatic differences in cTEC numbers in males relative to other groups, we first analyzed TEC proliferation using two models. In the first model, the percentage of cycling cells

was assessed using Ki-67 staining. As previously observed in adult mice¹⁸¹, mTECs proliferated more actively than cTECs in all groups ($p < 0.05$, Figure 2.1C, p.42). Interestingly, males displayed a significantly lower percentage of Ki-67+ cTECs than females and Cx males (Figure 2.1C, p.42). The mTEC compartment showed a similar tendency which, however, did not reach significance. In the second model, we use the H2B-GFP:rtTA transgenic mouse model in which the extent of cell proliferation can be inferred from H2B-GFP fluorescence intensity (see Supplementary Figure S1.1B, Annex I, p. ii)^{181,269}. After administration of doxycycline during 6 weeks, TEC populations were analyzed during a chase period of 16 weeks (Figure 2.1D, p.42). Nonlinear regression analysis of H2B-GFP dilution revealed that cTECs and mTECs in adult mice proliferated less actively in males than in females and Cx males (Figure 2.1B,D, p.42). The half-life of GFP+ TECs was similar in females and Cx males (Figure 2.1B, p.42). Therefore, both methods yielded congruent results showing that cTECs proliferate less actively in males than in females and Cx males. Hence, the greater abundance of cTECs in males cannot be ascribed to a higher proliferation rate. Also, since low levels of androgens is the sole feature that differentiates males from both Cx males and females (Supplementary Figure S1.1A, Annex I p. ii), these results suggest that androgens have an anti-proliferative effect on TECs, and particularly on cTECs.

Next, we evaluated the correlation between TEC proliferation and cellularity after 16 weeks of chase. Surprisingly, there was a modest positive correlation ($R = 0.3590$) between the percentage of GFP+ cTECs and the number of cTECs (Figure 2.1E, upper left, p.42). This means that thymi in which cTECs proliferate more actively (and therefore have a low percentage of GFP+ cells) actually have less cTECs. As a corollary, there must be a greater loss of cTECs in females and Cx males than in males. Two non-mutually exclusive mechanisms may be responsible for cTEC loss: cTEC apoptosis vs. differentiation of cTEC-phenotype cells into mTEC-phenotype cells. The latter possibility can not be

discarded since the cTEC compartment (EpCAM+Ly51+UEA1-) contains bipotent TEC progenitors that can ultimately adopt a cTEC or an mTEC fate^{83,110}. Besides, proliferation of cTECs was highly correlated with mTEC proliferation ($R = 0.9157$) (Figure 2.1E, upper right, p.42). Furthermore, global TEC proliferation showed a significant correlation ($R = 0.5518$) with overall thymic cellularity (i.e., thymocyte numbers; Figure 2.1E, lower left, p.42) but not with TEC numbers (Figure 2.1E, lower right, p.42). The facts that cTEC proliferation was positively correlated with mTEC proliferation and thymocyte numbers suggests that cell proliferation in these three cell compartments may be co-regulated.

2.4.3.2 The impact of sex on the transcriptome of TEC subsets – An overview.

In order to assess the extent and molecular bases of sexual dimorphism in adult TECs, we performed RNA sequencing on cTECs and mTECs from 6 month-old mice from our three experimental groups (see gating strategy in Supplementary Figure S1.1C, Annex I, p. ii). DEGs were determined with the DESeq package²⁷⁰ using the following criteria: adjusted p value < 0.1 , fold change ≥ 1.5 and minimal mean expression of 1 RPKM. A total of 1,440 and 1,783 DEGs were found in the 3 experimental groups in cTECs and mTECs, respectively (Figure 2.2A, p.45).

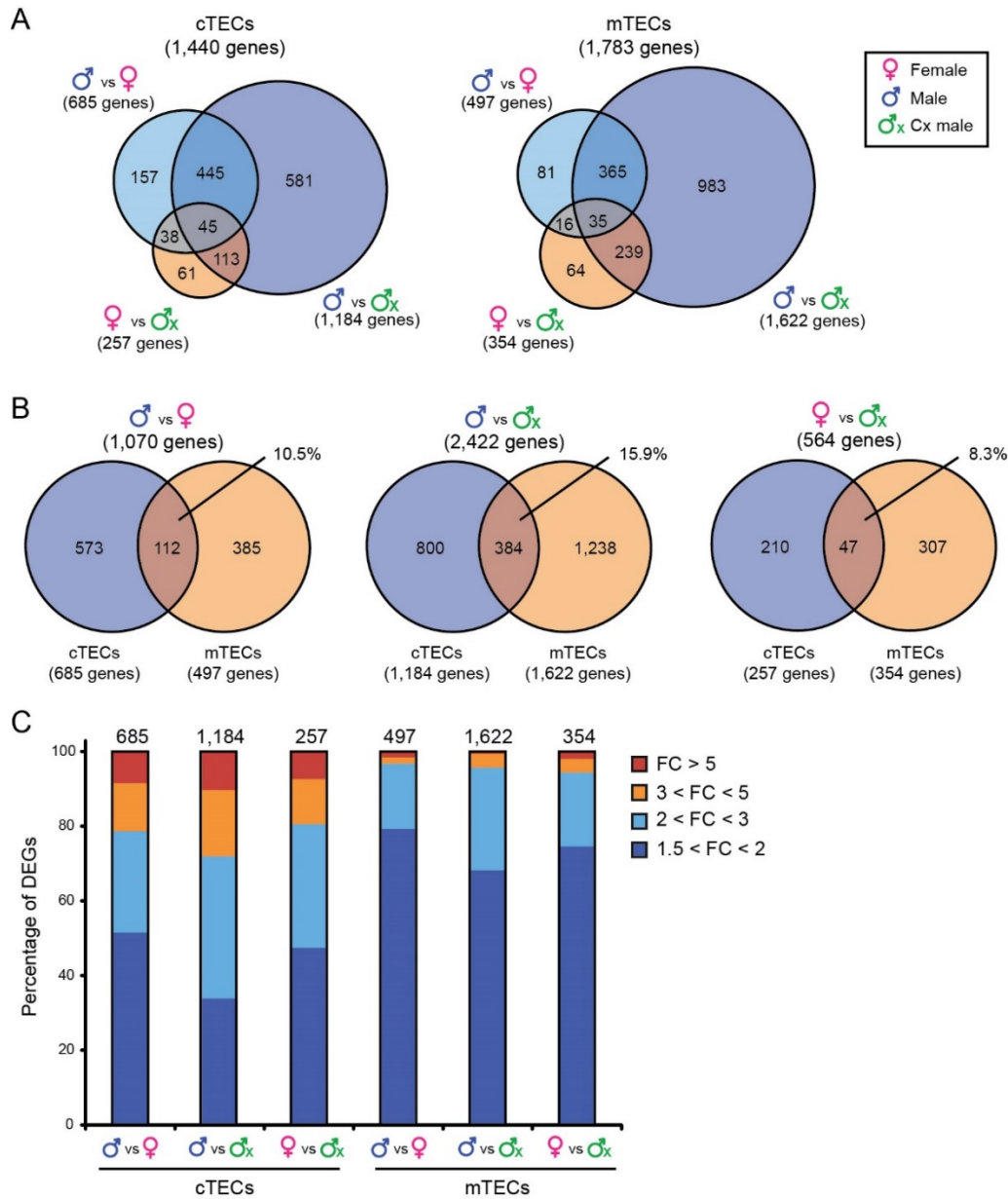


Figure 2.2 | Transcriptomic signatures of cTECs and mTECs in 6 month-old male, female and Cx male mice

(A) Venn diagram representation of DEGs in cTECs and mTECs from the three experimental groups. (B) Overlap between DEGs in cTECs and mTECs. (C) Percentages of DEGs for selected thresholds of mRNA expression fold-change (FC). Numbers of DEGs are indicated above bars.

As observed in other tissues, sex-related differences in gene expression were generally modest, being < 3-fold in most cases (Figure 2.2C, p.45). Males and Cx males showed the greatest number of DEGs, with 1,184 (82%) and 1,622 (91%) DEGs in cTECs and mTECs,

respectively. This result was striking since the sole physiological difference between these two groups is the level of androgens (Supplementary Figure S1.1A, Annex I, p. ii). Together with the relatively low number of DEGs in females vs. Cx males (Figure 2.2A, p.45), these data indicate that androgens have a greater impact on TEC transcriptome than female sex hormones or the type of sex chromosomes. Previous studies on other types of somatic cells have shown that sexual dimorphism in gene expression is highly tissue-specific^{266,267}. This was vividly illustrated by the fact that in various pairwise comparisons, we found that only 8 to 16% of DEGs were common to cTECs and mTECs (Figure 2.2B, p.45).

2.4.3.3 Androgens inhibit cell death and cell differentiation in TECs.

To better understand of the impact of sex hormones on TEC function, we performed a downstream effect analysis on our lists of DEGs using the Ingenuity Pathway Analysis software (IPA, Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). We used two metrics to identify the most important downstream effects of these DEGs: activation Z-score and *p*-value. Positive and negative Z-scores indicate increased and decreased functional activity, respectively. The *p*-value, calculated with the Fischer's exact test, indicates the likelihood that the association between a set of DEGs and a biological function is significant. The complete list of biological processes regulated by DEGs can be found in Supplementary Figures S1.2 (Annex I, p. iii) and S1.3 (Annex I, p. iv). Of particular relevance in view of differences in TEC subsets depicted in Figure 2.1 (p.42), the following functional categories were highlighted as being differentially activated in the three experimental groups: cell death and survival and cell differentiation (Figure 2.3, p.47). More specifically, IPA analysis predicted that, relative to the two other groups, male TECs would show i) less cell death (cTECs and mTECs) and ii) less cell differentiation (mTECs). Superior cTEC survival coupled to lessened differentiation of

cTEC-phenotype progenitors into mTECs offer a plausible explanation for the higher numbers of cTECs observed in males (Figure 2.1A, p.42).

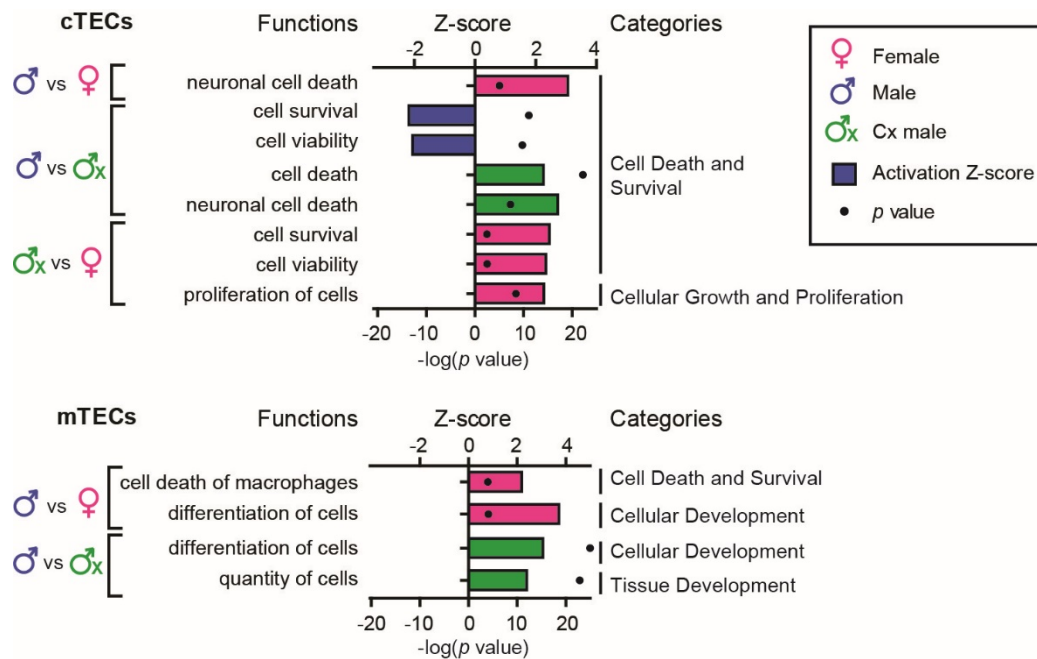


Figure 2.3 | IPA analysis of DEGs in cTECs and mTECs

IPA analysis of DEGs predicts decreased cell death and cell differentiation in males. Activation Z-scores are depicted with bars, whereas p values are shown with black dots. The color of bars shows in which group a given process is activated (e.g., blue = males). All functions represented on the graph were significantly enriched ($p < 0.05$).

We then sought to gain further mechanistic insights into processes regulated by sex hormones by analyzing relevant DEGs, i.e. genes whose differential expression was consistent with the predicted activation status in the three experimental groups (Figure 2.4, p.49). Genes were separated into activators or inhibitors of cell death or cell differentiation. The dataset related to cell death included DEGs associated with the following functional categories: cell death and survival, cellular growth and proliferation, and tissue development. Notably, *Pax9* and *Sgpl1*, which are known to regulate TEC survival and apoptosis^{105,271}, were among DEGs linked to inhibition of cell death in male

TECs (Figure 2.4A, p.49). Furthermore, many genes known to regulate survival of different epithelial cell types are present in that list, including *Sgk1*, *Id1*, *Vdr*, *Bcl2l14*, *Dusp1*, *Bmx* and *Igfbp3* (mammary gland), *Pgf*, *Irf5*, *Pla2g4a* and *Pmepa1* (intestine), and *Hspa1a* (ovary)^{272–274}.

Finally, several members of key pathways regulating cell survival/death were among sexually dimorphic genes: heat shock proteins (*Hspa1a*, *Hspa1b*, *Hspa2*, *Hspb1*) and members of the p53 (*Rnd3*, *Plk2*, *Sgpl1*, *Igfbp3*, *Pmepa1*), Pi3k/Akt (*Pik3r1*, *Pdgfc*, *Fn1*) and Fas/caspases pathways (*Mcl1*, *Hspa1b*, *Fn1*, *Bcl2l14*, *Lum*).

On the other hand, many genes which are instrumental in differentiation of ectoderm- and endoderm-derived epithelia were differentially expressed and may therefore contribute to the inhibition of cell differentiation in male mTECs: *Elf5*, *Oxt*, *Dmbt1*, *Areg*, *Spp1* (mammary gland), *Kitl*, *Alox8*, *Dsc1*, *Atf3* (skin), *Notch3*, *Mir17hg* and *Foxa2* (lung epithelial cells), *Ccnd1*, *Cdkn2a* and *Dmbt1* (colon)^{275–277}. In conclusion, IPA analysis provides a molecular framework that can explain why cell death and cell differentiation are inhibited in male TECs relative to female and Cx male TECs.

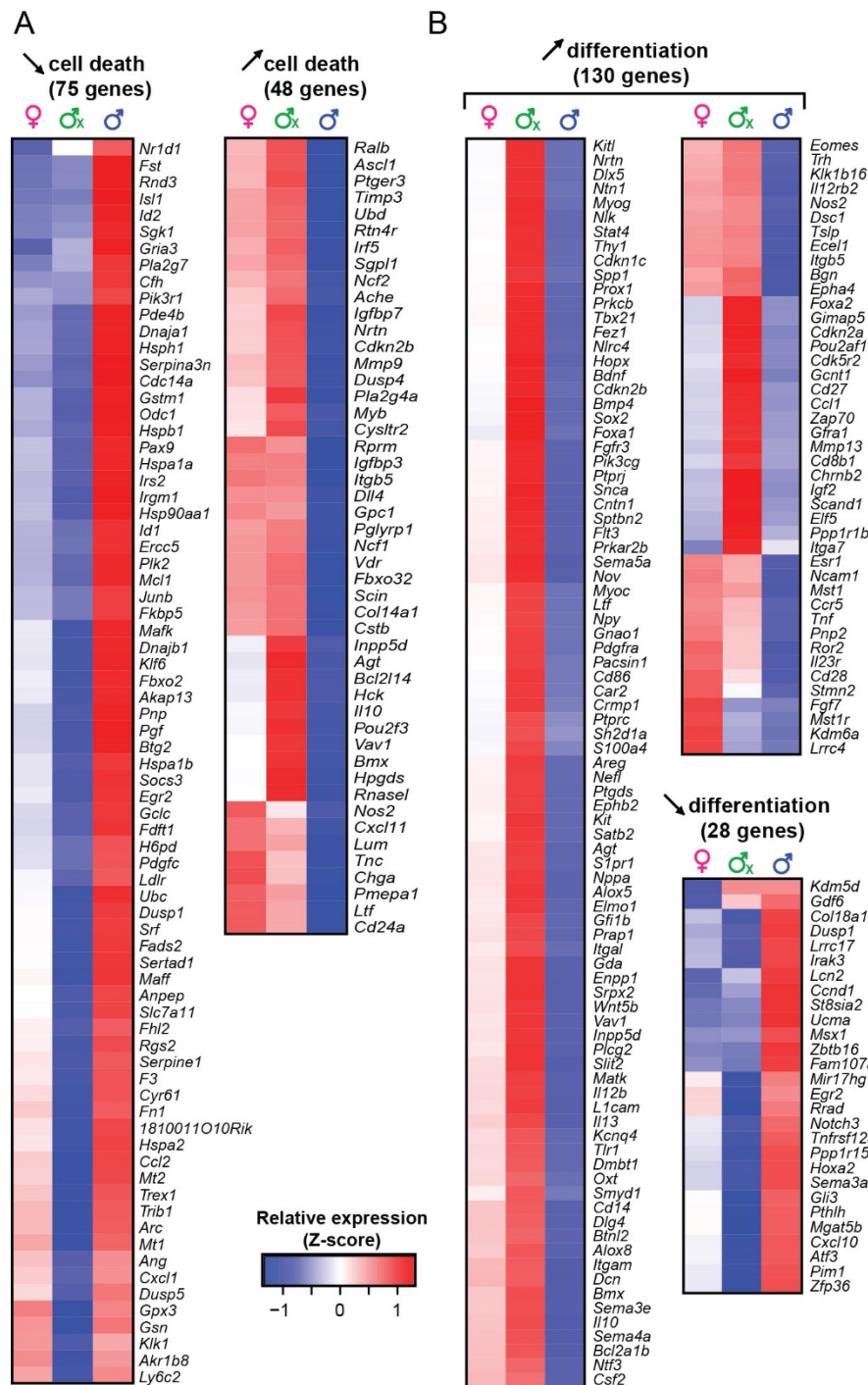


Figure 2.4 | Relative expression of genes contributing to the inhibition of cell death and cell differentiation in male TECs

(a) Relative expression of genes that affect cell death in cTECs. (b) Relative expression of genes that affect cell differentiation in mTECs. Relative gene expression is depicted as a Z-score, calculated separately for cTECs and mTECs. Red corresponds to higher expression, whereas blue corresponds to lower expression.

2.4.3.4 Androgens impact on genes involved in thymopoiesis.

IPA analysis of DEGs in the three experimental groups predicted that several functions linked to T-cell production were inhibited in male TECs. These functions included stimulation, homing and chemoattraction of lymphoid cells (Figure 2.5A, p.51). DEGs involved in these functional categories included several cytokines, transcription factors and costimulatory molecules of known prime relevance in thymopoiesis (Figure

2.5B, p.51). *Foxn1*, the key regulator of thymus development and maintenance^{208,278}, was downregulated by ~2 fold in cTECs from males relative to females and Cx males. In accordance with this, expression of *Foxn1* targets *Ccl25*, *Dll4*, *Pax1* and *Kitl*^{11,279} was also lower in male cTECs. Other genes having a crucial role in thymocyte development^{121,280,281} were also downregulated in male cTECs: i) *Psmb11* (AKA $\beta 5t$), a cTEC-specific proteasome subunit required for positive selection of CD8 thymocytes⁴¹, ii) *Ctsl*, a peptidase instrumental in the positive selection of CD4 thymocytes⁴⁵ and iii) *Tnfrsf11a* (AKA RANK), the TNF family receptor necessary for mTEC maturation¹¹⁴. Overall, these data suggest that androgens have a negative impact on TEC-mediated processes that are central to normal thymopoiesis.

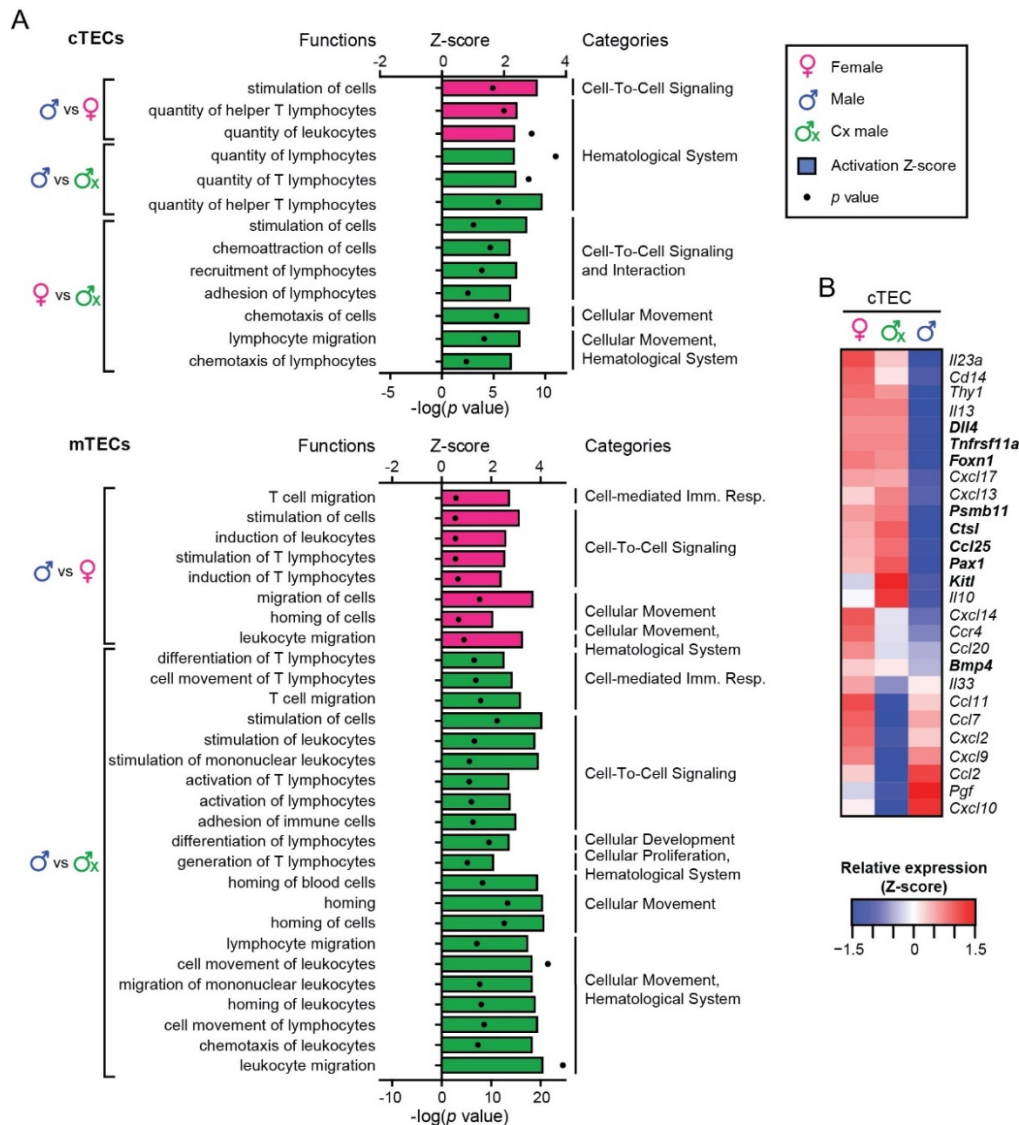


Figure 2.5 | Several TEC genes involved in thymopoiesis are downregulated in male TECs

(A) IPA analysis of DEGs predicts differential activation of biological functions related to homing, stimulation of cells, chemotaxis and production of T lymphocytes. Activation Z-score is depicted with bars, whereas p values are shown with black dots. The color of bars shows in which group a given process is activated (e.g., green = Cx males). All functions represented on the graph are significantly enriched ($p < 0.05$). (B) Heatmaps of relative cTEC expression of IPA-discovered genes that may affect thymopoiesis. Genes that have well-characterized functions in the thymus are highlighted in bold. The gene expression is depicted as a Z-score, calculated separately for each cell type. Red corresponds to higher expression, whereas blue corresponds to lower expression.

2.4.3.5 Sex hormones inhibit promiscuous gene expression in mTECs.

Induction of so-called “central tolerance” in the thymic medulla depends on ectopic expression of proteins otherwise restricted to differentiated organs in the periphery³⁴. Collectively, mTECs express almost all protein-coding genes^{282,283} and can therefore induce tolerance to a wide array of tissue-restricted antigens (TRAs). Promiscuous gene expression by mTECs is therefore essential to induce tolerance to “extrathymic proteins”, and is regulated in part by the autoimmune regulator (AIRE). According to IPA analysis, several upstream regulators were differentially activated in mTECs from our three experimental groups (Figure 2.6A, p.53). One of the top regulators was *Aire*, which was activated in mTECs from Cx males compared to males and females (Figure 2.6A, p.53). This led us to evaluate expression of TRAs in mTECs from our three groups. We adopted the definition stipulating that TRA-coding genes are those that are tissue-enriched (*i.e.* expressed at relatively high levels) in at most five tissues²⁸⁴. Our definition of AIRE-dependent and -independent TRAs was based on RNA-seq analysis of mTECs from wild-type and *Aire*^{-/-} littermates (St-Pierre C. *et al*, 2015). We found that *Aire*-dependent TRAs were significantly upregulated in Cx males compared to females (red) and males (turquoise), whereas males and females showed no difference (orange, Figure 2.6B, p.53). Furthermore, Cx males expressed higher levels of *Aire*-independent TRAs than males, although the difference was less than for *Aire*-dependent TRAs (Figure 2.6B, p.53). However, *Aire* expression was similar in the three experimental groups (Figure 2.6C, p.53). We conclude that sex hormones repress the promiscuous gene expression of *Aire*-dependent and -independent TRAs without affecting the expression of *Aire* itself.

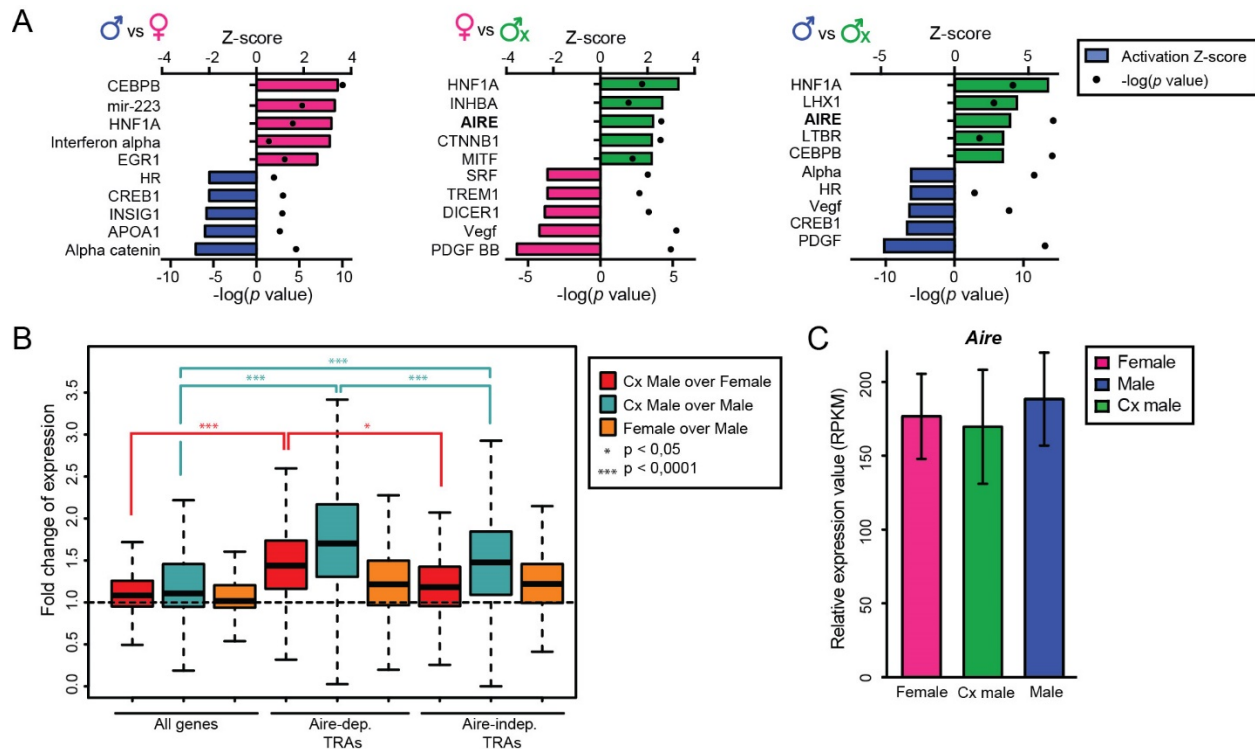


Figure 2.6 | Cx male show higher expression of TRAs

(A) Ten most activated upstream regulators predicted by IPA analysis of mTECs DEGs in female vs male (left), in Cx male vs female (center) and in Cx male vs male (right, all predicted activators shown are significant $p < 0.05$). The color of bars shows in which group a given upstream regulator is activated (e.g., blue = males). (B) Fold-difference in expression of all genes, Aire-dependent TRAs and Aire-independent TRAs in mTECs. The gene expression ratio (\log_2 RPKM) of Cx male over female is depicted in red, of Cx male over male in turquoise and of female over male in orange. (C) Relative expression of *Aire* in mTECs (RPKM).

2.4.4 Discussion

The present work shows that sex hormones have pervasive effects on the transcriptome of TECs: the number of DEGs was 1,440 in cTECs and 1,783 in mTECs (Figure 2.2A, p.45). Studies on adipocytes as well as brain, liver and muscle cells revealed that sex-related changes in gene expression were highly tissue-specific^{266,267}. It is remarkable that the same holds true in cells that are as closely related, ontogenetically, as cTECs and mTECs. Indeed, the overlap between cTEC DEGs and mTEC DEGs in various pairwise comparisons was only about 12% (Figure 2.2B, p.45). This means that the sex differences are exquisitely context dependent.

Sexual dimorphism was particularly conspicuous in cTECs where it was mainly regulated by the high or low concentrations of androgens. Androgens induced an accumulation of cTECs that were hypoproliferative and presented features suggestive of functional impairment. The low proliferation rate of male TECs can be explained by a low expression of *Foxn1* and its main targets, the former being required for both fetal and adult thymopoiesis²⁷⁸. In adult mice, minor variations in the expression or function of *Foxn1* directly impact on thymic cellularity^{99,208}. Interestingly, thymic cellularity (i.e., number of thymocytes) correlated with TEC proliferation (higher in females) (Figure 2.1E, p.42) but not with cTEC or total TEC numbers (higher in males) (Figure 2.1A,E, p.42). This observation is consistent with the fact that thymic output in human adults (number of signal-joint T cell receptor excision circles/T cell) is higher in females than males¹²⁹. In addition, numerous genes that are instrumental in thymocyte development were repressed in male cTECs (Figure 2.5, p.51). These DEGs included genes driving thymocyte expansion (e.g., *Dll4*) and positive selection (*Psb11* and *Ctsl*) and whose repression can certainly impinge on thymopoietic activity.

But if cTECs proliferate more in females than males, why are they less abundant in females? Our IPA analyses suggest that cTEC accumulation in males results from

enhanced survival coupled to impairment of cell differentiation (Figure 2.4, p.49). Given the large numbers of relevant DEGs, direct evaluation of the role of individual genes would require numerous gain- and loss-of-function experiments. Finally, is there any rationale for the superior proliferative potential of female over male cTECs? Our favorite hypothesis is that evolution has favored high cTEC renewal potential in females because of the constraints imposed by pregnancy. Pregnancy causes a major, though transient, TEC-dependent thymic involution which is instrumental in enhancing reproductive fitness^{132,149}. This process is progesterone-dependent, and transplantation of a progesterone receptor null thymus in thymectomised wild-type female mice impairs fertility. Relative to recipients of a wild-type thymus, mice grafted with a progesterone receptor null thymus have smaller litters and higher numbers of resorbing embryos¹⁴⁹. We therefore speculate that a high cTEC renewal potential allows females to withstand pregnancy-associated thymic involution and regain adequate thymic function rapidly in the postpartum period.

Unexpectedly, we found that both female and male sex hormones repressed promiscuous gene expression in mTECs. Both AIRE-dependent and -independent TRAs were expressed at higher levels in Cx males than in females and males. Hence, while sex hormones did not affect the expression of *Aire* per se, they must impinge on the activity of AIRE cofactors or unidentified regulator(s) of promiscuous gene expression in mTECs. Is this effect biologically significant? We speculate that, at least for the *Aire*-dependent TRAs, lower TRA expression in adult is probably not biologically important under physiological conditions. Indeed, Aire-controlled mechanisms of central tolerance are largely dispensable in the adult²⁸⁵. However, we hypothesize that the effect of sex hormones on TRA expression may be highly relevant in the context of allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT) in adults. Indeed, following AHCT, donor hematopoietic progenitors must undergo a second round of ontogeny in the recipient's

thymus, in the presence of sex hormones if the recipient is an adult. During this period, the occurrence of graft-versus-host disease in many recipients leads to loss of AIRE⁺ mTECs and thereby to generation of autoreactive T cells²⁸⁶. By extension, our data would suggest that sex hormones might have a negative impact on the establishment of graft-host tolerance and might explain why post-AHCT autoimmunity [i.e., chronic graft-versus-host disease²⁸⁶] is much more common in adults than children²⁸⁷. If this were the case, pharmacological antagonists of sex hormones could mitigate the risk of chronic graft-versus-host disease, which remains the unrelenting nemesis of patients and physicians involved in AHCT^{287,288}.

The sexual dimorphism of TECs highlighted here may be mechanistically linked to the well-recognized sex differences in susceptibility to infections and tissue-specific and systemic autoimmune diseases²⁵⁴. While these complex issues may be tackled from different perspectives, our next objective will be to investigate whether the sexual dimorphism of cTECs impacts on the diversity of the T-cell repertoire.

2.4.5 Methods

2.4.5.1 Mice

C57BL/6 mice, B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(rtTA^{*}M2)}^{lac}/J and STOCK Tg(tetO-HIST1H2BJ/GFP)47Efu/J mice purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor) were bred and housed under specific-pathogen-free conditions in sterile ventilated racks at the Institute for Research in Immunology and Cancer. For H2B-GFP pulse-chase experiments, doxycycline was incorporated in food (2 g/kg) (Hartlan Laboratories) or in drinking water (2 mg/ml of doxycycline supplemented with 5% sucrose) (Sigma Aldrich)¹⁸¹. The pulse period lasted for six weeks and was initiated at 4-6 weeks of age. All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Comité de Déontologie et Expérimentation Animale de l'Université de Montréal.

2.4.5.2 Castration

Four week-old male mice were anesthetized and a small incision in the scrotal region was made to expose the testes. Testes were tied off with suture thread and removed.

2.4.5.3 Flow cytometry analysis and sorting

Enrichment of thymic stromal cells was performed as previously described^{282,289}. Thymic stromal cells were stained with biotinylated Ulex Europaeus Lectin 1 (UEA1; Vector Laboratories) and PE-Cy7 or PE-TexasRed conjugated streptavidin (BD Biosciences) and the following antibodies: i) AlexaFluor-700 anti-CD45 from BD Biosciences, ii) AlexaFluor-647 anti-Ly51 and APC-Cy7 anti-EpCAM from BioLegend. Staining with 7-AAD and PE conjugated anti-Ki-67 (BD Biosciences) was used to assess

cell viability and the proportion of cycling cells. TECs were selected as CD45-EpCAM+, and mTECs and cTECs were defined as UEA-1+Ly51- and UEA-1-Ly51+, respectively. Intracellular staining of Ki-67 was performed using the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Affymetrix eBiosciences). For flow cytometry analyses, each group contained 4-8 mice per time point. For RNA sequencing analysis, groups of 4-6 mice were pooled for each replicate to obtain a minimum of 6,000 cells. Live cTECs and mTECs were sorted on a three laser FACS Aria or analyzed on a three laser LSR II using FACSDiva (BD Biosciences) and FlowJo VX.0.7 (FlowJo Enterprise) softwares.

2.4.5.4 RNA sequencing experiments

Total RNA was isolated using Trizol™ as recommended by the manufacturer (Invitrogen), and then further purified using RNeasy Micro columns (Qiagen). Sample quality was assessed using Bioanalyzer RNA Pico chips (Agilent). Transcriptome libraries were made using the TruSeq RNA Sample Prep Kit (v2) (Illumina) following the manufacturer's protocols. Library generation was then assessed using a Bioanalyzer platform (Agilent) and Illumina MiSeq-QC run. Then, sequencing was done using an Illumina HiSeq2000 using TruSeq SBS v3 chemistry at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Genomics Platform. Cluster density was targeted at around 800k clusters/mm². Data was mapped to the *Mus musculus* (mm10) reference genome using the ELANDv2 alignment tool from the CASAVA 1.8.2 software (Illumina). RNA-seq data have been deposited in GEO archives (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE66873 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE66873>). Analyses of RNA sequencing data were performed using the publicly available statistical software package "R" (<http://www.r-project.org/>). Differentially expressed genes (DEGs) were determined with the DESeq package from Bioconductor (<http://bioconductor.org/>), using thresholds of adjusted p-value of 0.1 and a minimal fold change of 1.5. To remove genes that were

lowly expressed in our analysis, we further filtered the DEGs to only keep genes that had at least one sample with a relative expression higher than 1 read per kilobase of exon model per million reads mapped (RPKM). Enrichment of biological functions and predicted upstream regulators were assessed using the IPA software (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>).

2.4.5.5 Statistical analyses

Unless stated otherwise, results are expressed as means \pm SD, statistical significance was tested using Student unpaired two-tailed t test, and differences with a p value < 0.05 were considered significant. Significant differences in the percentages of Ki-67+ cells were assessed using a one-way ANOVA and a Newman-Keuls post-hoc test. The half-life of GFP+ cells were calculated using a one-phase decay nonlinear regression analysis and significance was assessed using an extra sum-of-squares F test. Correlations were calculated using Pearson's correlation test. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software V5.01.

2.4.6 Acknowledgements

We are grateful to Danièle Gagné and Gaël Dulude (flow cytometry and cell sorting), Marianne Arteau (RNA sequencing experiments), to Isabelle Caron for the surgical procedures and to the staff of IRIC animal care facility for their assistance. Special thanks to Sébastien Lemieux for advice on statistical analyses. This work was supported by grant MOP 42384 from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). MDL is supported by a CIHR studentship and CP holds a Canada Research Chair in Immunobiology. The Institute for Research in Immunology and Cancer is supported in part by the Canada Foundation for Innovation and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

2.4.7 Authors contributions

MDL and CSP performed experiments and analyzed data. MDL and CP designed the study and wrote the first draft of the manuscript. All authors discussed results and reviewed the manuscript.

2.4.8 Additional information

Supplementary information accompanies this paper: 3 supplementary figures and 1 supplementary table.

2.4.9 Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Chapitre 3 - Identification de progéniteurs quiescents et radio-résistants dans l'épithélium thymique adulte

3.1 Résumé

Le vieillissement du thymus précède celui des autres organes et est initié par une perte graduelle des cellules de l'épithélium thymique. Des études récentes s'appuyant sur des essais *in vitro* et des transplantations *in vivo* ont montré la présence de progéniteurs épithéliaux thymiques (TEPC) dans de jeunes souris adultes. Cependant, les rôles physiologiques et les propriétés de ces TEPC restent méconnus. En utilisant un modèle *in vivo* de rétention de marqueur, nous avons précédemment identifié une sous-population de TEC quiescentes, mais non-sénescents. Les objectifs de cette présente étude étaient donc i) d'évaluer la contribution de ces TEC quiescentes pendant un phénomène de régénération thymique suivant une insulte aiguë provoquée par irradiation sub-léthale et ii) d'évaluer le phénotype et le profil moléculaire de ces cellules par immunofluorescence, cytométrie en flux et analyse transcriptomique.

Nos résultats ont montré d'une part que les TEC UEA1+ sont celles qui prolifèrent le plus activement en conditions normales, mais sont grandement affectées par l'irradiation, qui causent une perte de cellules UEA1+ et l'arrêt de leur prolifération. D'autre part, nous avons observé que les TEC quiescentes de la sous-population UEA1- sont radio-résistantes et augmentent leur prolifération suivant l'irradiation sub-léthale, contribuant ainsi à la régénération thymique chez les souris adultes de 28 à 30 semaines. Les TEC quiescentes UEA1- possèdent un phénotype non différencié, caractérisé par la co-expression des cytokératines K5 et K8 et une expression forte de gènes impliqués dans la régulation de l'activité des cellules souches de différents tissus (par exemples *Podxl* ou *Ptprz1*). De plus, deux particularités des TEC quiescentes UEA1- suggèrent que ces

cellules occupent des niches stromales distinctes : (1) les TEC quiescentes sont localisées principalement en groupes à la jonction cortico-médullaire et (2) elles sur-expriment des gènes impliqués dans la communication avec les cellules mésenchymateuses. Les TEC quiescentes UEA1- se qualifient donc à titre de progéniteurs *in vivo*, de par leur capacité à participer à la régénération thymique suivant une insulte aiguë telle que l'irradiation sub-léthale.

3.2 Contributions

J'ai effectué la majorité des expériences, la collecte des données et les analyses, avec l'aide de Hervé Gerbe et de Tariq Daouda. J'ai conçu le design expérimental et écrit le manuscrit conjointement avec Tariq Daouda, Étienne Gagnon et Claude Perreault. Tous les auteurs ont discuté des résultats, participé à l'interprétation des données et révisé le manuscrit.

3.3 Référence de publication

Dumont-Lagacé, Maude, Hervé Gerbe, Tariq Daouda, Jean-Philippe Laverdure, Sylvie Brochu, Sébastien Lemieux, Étienne Gagnon, and Claude Perreault. "Detection of Quiescent radioresistant epithelial Progenitors in the adult Thymus." *Frontiers in immunology* (2017); 8.

3.4 Article

Detection of Quiescent Radioresistant Epithelial Progenitors in the Adult Thymus

Maude Dumont-Lagacé^{1,2}, Hervé Gerbe¹, Tariq Daouda^{1,3}, Jean-Philippe Laverdure¹, Sylvie Brochu¹, Sébastien Lemieux^{1,4}, Étienne Gagnon^{1,5} and Claude Perreault^{1,2,*}

Keywords: Thymic epithelial cells, stem cells, thymic regeneration, label-retention assay, transcriptomics

¹Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal, QC, Canada

²Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

³Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

⁴Department of Informatics and Operational Research, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

⁵Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

3.4.1 Abstract

Thymic aging precedes that of other organs and is initiated by the gradual loss of thymic epithelial cells (TECs). Based on *in vitro* culture and transplantation assays, recent studies have reported on the presence of thymic epithelial progenitor cells (TEPCs) in

young adult mice. However, the physiological role and properties of TEPC populations reported to date remain unclear. Using an *in vivo* label-retention assay, we previously identified a population of quiescent but non-senescent TECs. The goals of the present study were therefore i) to evaluate the contribution of these quiescent TECs to thymic regeneration following irradiation-induced acute thymic injury, and ii) to characterize their phenotypic and molecular profiles using flow cytometry, immuno-histology and transcriptome sequencing. We report that while UEA1+ cells cycle the most in steady-state, they are greatly affected by irradiation, leading to cell loss and proliferative arrest following acute thymic involution. On the opposite, the UEA1– subset of quiescent TECs are radioresistant and proliferate *in situ* following acute thymic involution, thereby contributing to thymic regeneration in 28-30 weeks old mice. UEA1– quiescent TECs display an undifferentiated phenotype (co-expression of K8 and K5 cytokeratins) and express high levels of genes that regulate stem cell activity in different tissues (e.g., *Podxl*, *Ptprz1*). Additionally, two features suggest that UEA1– quiescent TECs occupy discrete stromal niches: i) their preferential location in clusters adjacent to the cortico-medullary junction, and ii) their high expression of genes involved in crosstalk with mesenchymal cells. The ability of UEA1– quiescent TECs to participate to TEC regeneration qualifies them as *in vivo* progenitor cells particularly relevant in the context of regeneration following acute thymic injury.

3.4.2 Introduction

In all vertebrates, the thymus is the sole organ that can generate functional classic (TCR $\alpha\beta$ +) T lymphocytes²⁹⁰. Thymic epithelial cells (TECs) are responsible for the unique properties of the thymus: they orchestrate each steps of T-cell development and regulate thymic output^{291,292}. In adults, the production of naive T cells gradually decreases with age, a decline caused by the loss of TECs which entails a reduction in the TCR repertoire diversity²⁸⁰. It was therefore somewhat surprising to realize that TECs are not post-mitotic cells and that they retain extensive regenerative capacities even in adults^{142,208}. Indeed, medullary TECs (mTECs), and to a lesser extent cortical TECs (cTECs), turnover rapidly in healthy animals^{116,142,181}. In addition, the thymus has the ability to regenerate following a variety of acute injuries induced by stress, infection, sublethal irradiation or pregnancy^{74,132,153,156,234}. However, more severe injuries inflicted by chemotherapy or radiation therapy can overwhelm the regenerative potential of the thymic epithelium and lead to prolonged immune deficiency^{293,294}. Since tissue repair is usually driven by stem-progenitor cells, identification of thymic epithelial progenitor cells (TEPCs) responding to thymic injury should provide key insights into the mechanisms of thymic regeneration.

A variety of stem cells including hematopoietic stem cells²⁹⁵, muscle satellite cells²⁹⁶, and hair follicle stem cells²⁶⁹ are quiescent in steady-state conditions. We therefore hypothesized that isolation of non-dividing TECs might enable us to enrich for a population of quiescent TEPCs. To this end, we used an *in vivo* label-retaining cell (LRC) assay in which cells expressed a histone 2B-GFP fusion protein (H2B-GFP) inducible under the control of the reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA). Using this approach, we have previously shown that in adult mice, the UEA1⁻ TECs (mostly cortical TECs) contain more LRCs than UEA1⁺ TECs (medullary TECs), and that non-dividing UEA1⁻ LRCs were quiescent rather than senescent¹⁸¹. Indeed, UEA1⁻ LRCs expressed

low levels of senescence-associated transcripts (*p16INK4*, *p19ARF*, and *Serpine1*) and high levels of transcripts instrumental to TEC regeneration (*Bmi1*, *Trp63*, and *Wnt4*).

Previous studies have shown that transplantation can activate stem cell behavior in cells that do not act as stem cells in normal situation²⁹⁷. The goal of the present study was therefore to evaluate the contribution of endogenous (untransplanted) LRCs to thymus regeneration and to gain further insights into their *in situ* spatial distribution and molecular attributes. In addition, we wished to evaluate the proliferative activity of TEC subsets in two settings: steady-state conditions vs thymic regeneration following acute injury. We report that while the nonquiescent UEA1+ TECs cycle more actively than other TEC subsets under steady-state conditions, they are greatly affected by irradiation, leading to cell loss and a significant decrease in their proliferative activity. On the contrary, while other TEC subsets (i.e. UEA1- TECs and quiescent UEA1+ TECs) proliferate modestly in physiological settings, they did not suffer cell loss from radiations. Interestingly, one particular TEC subset, the UEA1- LRCs, increased its proliferation during the regenerative phase following thymic injury induced by irradiation, showing that it contains quiescent radioresistant TEPCs activated during tissue repair.

Using immunofluorescence analysis, we observed that most LRCs co-express both K8 and K5 cytokeratins, an undifferentiated phenotype observed in embryonic TEPCs, and are located near the cortico-medullary junction (CMJ) where they form cell clusters. Furthermore, the transcriptomic profile of UEA1- LRCs showed low expression of genes implicated in interactions with thymocytes and high expression of genes involved in interactions with stromal cells and extracellular matrix (ECM). These results suggest that UEA1- LRCs are localized in specialized niches which are instrumental in the regulation of TEPCs activity. Finally, we identified six potential regulators of quiescent radioresistant TEPCs that are known to either regulate stem cell activity through niche

interactions in other tissues (*Podxl*, *Ptprz1*, *Angpt1*) or whose stromal cell ligands regulate thymic output (*Tgfrb3*, *Fzd4*, *Ar*).

3.4.4 Results

3.4.4.1 Experimental model

The ROSA26-rtTA;TetO-H2B-GFP transgenic mouse model allows the identification of slow-cycling cells through label retention in a pulse-chase assay^{269,298,299}. The reverse tetracycline transactivator (rtTA) allows doxycycline-inducible expression of H2B-GFP in all cells. The proliferative history of cells can therefore be evaluated by measuring the fluorescence intensity of the remaining H2B-GFP over time. After pulse, the H2B-GFP fluorescence of non-dividing cells remains above negative control (H2B-GFP+ WT, see Supplementary Fig. S2.2, Annex II, p. ix) for at least 6 months after doxycycline withdrawal, and at least 5 cell divisions are required for H2B-GFP to become undistinguishable from negative control by flow cytometry^{300,301}.

In adults, female TECs proliferate more actively than male TECs, mostly because of the inhibitory effect of androgens^{181,302}. Therefore, it is preferable to analyze TECs from both sexes separately. In the present study, we analyzed only female mice from which TECs (EpCAM+CD45-) were divided into two populations based on UEA1 expression (Supplementary Fig. S2.2A, Annex II, p. ix). As UEA1+ TECs derive from an undifferentiated UEA1- progenitor^{76,303}, we analyzed UEA1+ and UEA1- TECs, reasoning that progenitor cells should be enriched in the UEA1- compartment. The 6-weeks doxycycline treatment was initiated at 4-6 weeks of age (pulse) and was followed by a chase period of 16 weeks (26-28 weeks of age at time of analysis). We defined two fluorescence thresholds for experimental purposes: i) GFPhi cells, with the fluorescence intensity of LRCs, that is, cells that did not divide during the 16 weeks of chase, taking into account the 24-day half-life of the H2B-GFP protein (Supplementary Fig. S2.2B, Annex II, p. ix)³⁰⁴ and ii) GFPint cells, with a fluorescence intensity above the negative control but below the GFPhi threshold. The fluorescence intensity of LRCs (GFPhi) after

the chase period was at least 4 times higher than the threshold that distinguishes GFP⁻ from GFP^{int} cells (Supplementary Fig. S2.2B, Annex II, p. ix). This means that at the term of the chase period, an LRC would become GFP⁻ after a minimum of 3 cell divisions (8-fold GFP dilution). Henceforth, in flow cytometry analyses, the term LRC will only be used to refer to GFPhi cells.

Whereas the initial 6-week pulse enabled the homogenous and high GFP labeling of >75% of TECs, only a small proportion of TECs remains GFPhi (i.e. LRCs) after 16 weeks of chase: 5.5% of UEA1⁻ TECs and 1.8% of UEA1⁺ (Supplementary Fig. S2.2B and C, Annex II, p. ix). Approximately 60% of LRCs were UEA1⁻, even if only a third of TECs are UEA1⁻ (Supplementary Fig. S2.2C, Annex II, p. ix) This is consistent with previous studies showing that mTECs (UEA1⁺) turnover more rapidly than cTECs (UEA1⁻) in adult mice^{181,302}.

3.4.4.2 Most LRCs cluster in proximity to the CMJ

Using immunofluorescence microscopy, we first investigated the location and phenotype of LRC TECs after the 16-weeks chase period. In tissue sections, we defined TECs as cells expressing cytokeratin 8 (K8) and/or cytokeratin 5 (K5) and LRCs as cells having a fluorescence intensity four times greater than the cells with the maximal signal in the negative control (see Supplementary Fig. S2.1, Annex II, p. viii). Labeling with antibodies against K8 and K5

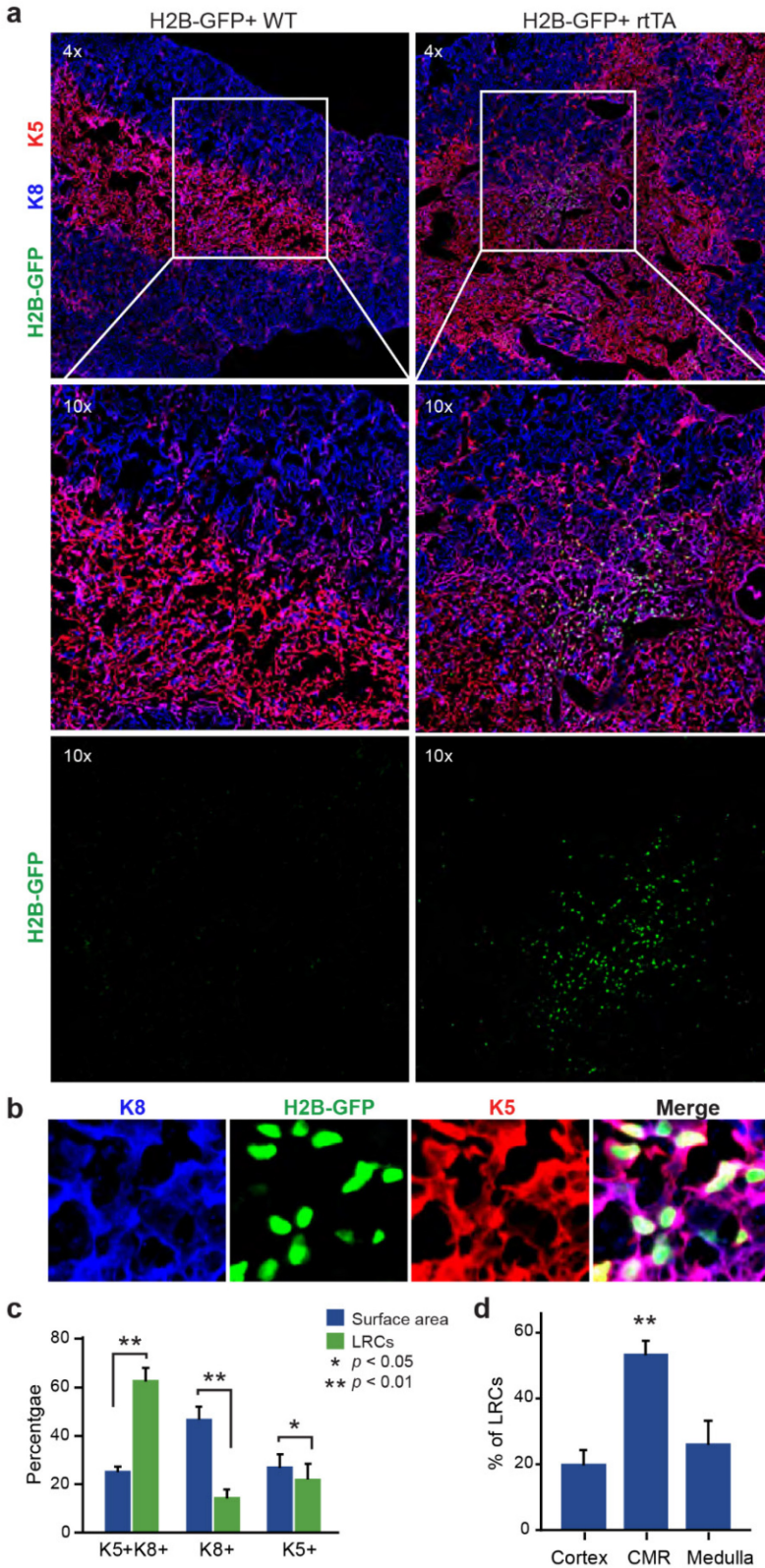


Figure 3.1 | Most LRCs are K5+K8+ and localized near the CMJ

(A) Representative images of thymic slices after 16 weeks of chase in control (H2B-GFP⁺ WT, left panels) and test mice (H2B-GFP⁺ rtTA, right panels). (B) Representative images of K5⁺K8⁺ GFP^{hi} cells. Cytokeratin K5 is shown in red, K8 in blue and H2B-GFP in green. (C) Quantification of LRCs expressing K5, K8 or both cytokeratins. The number of LRCs per thymic lobe (green) from each TEC subset is compared to the surface area (blue) covered by this subset. (D) Percentage of LRCs found in different regions of the thymus. The proportions of LRCs is significantly higher in the CMR than the cortex or the medulla (n = 4).

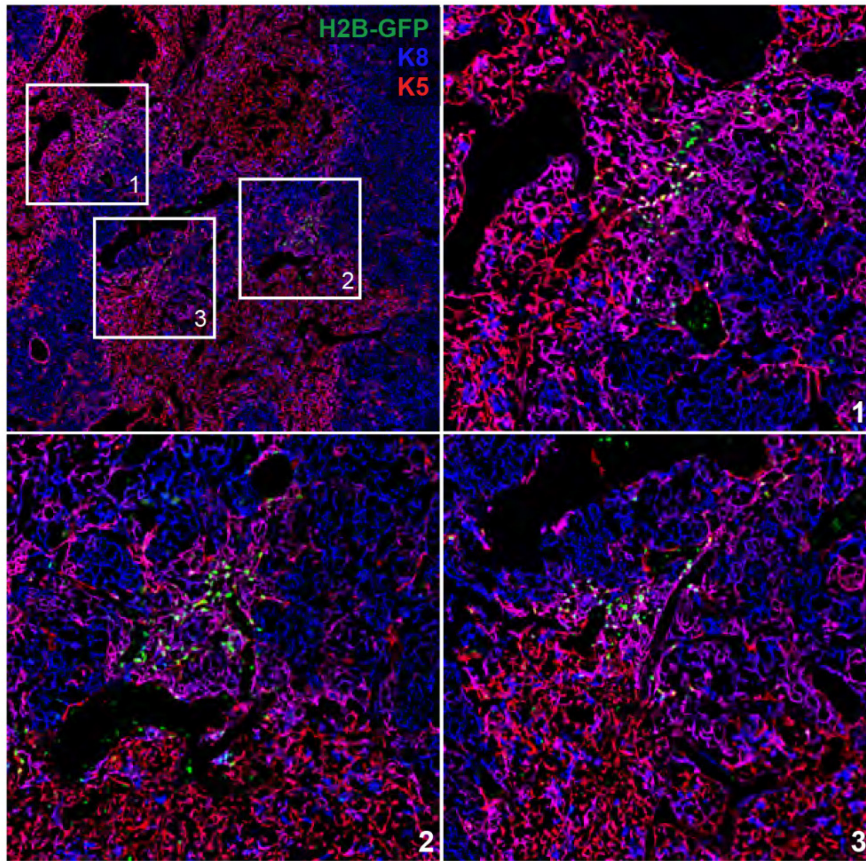
respectively defined cortical and medullary regions of the thymus

(Figure 3.1A, p.70). We evaluated the number of LRCs in each TEC subset (K5⁺, K8⁺ and

K5+K8+) and the relative surface area covered by individual subsets. The salient finding was that LRCs were depleted from the K8+ and K5+ population and significantly enriched in the K5+K8+ population (Figures 3.1B and 3.1C, p.70). Indeed, while K5+K8+ TECs only occupy 26% of the surface area, they contain 63% of the LRCs. Since expression of both K5 and K8 is typical of TEPCs at embryonic day E12.0⁷⁷ and becomes rare in the adult thymus, we conclude that most LRCs have a phenotype typical of undifferentiated TEPCs.

We next counted the number of LRCs found in each region of the thymus: cortex, medulla and cortico-medullary region (CMR). The CMR was defined as the area spanning 100µm on either side of the CMJ delimited by K5 (Supplementary Fig. S2.3A, Annex II, p. x). Notably, more than half of LRCs (53.6%) were found in the CMR (Figure 3.1D, p.70). We also observed that many LRCs formed clusters, while large regions of the stroma were devoid of any LRCs (Figure 3.2A, p.72). To quantify this phenomenon, we separated thymic slices in 40-50 non-overlapping sections of equal surface area (Supplementary Fig. S2.3B, Annex II, p. x) and counted the number of LRCs expressing at least one cytokeratin in each section. While individual sections contained an average of 16 LRCs, we observed that half (52.4%) of LRCs were located within sections containing >32 LRCs, a few even containing more than 100 LRCs each (Figure 3.2B, p.72). However, only 12.9% of all areas contained such clusters (in green, Figure 3.2B, p.72). To rule out the possibility that this distribution was random, we compared it to a Poisson distribution

a



b

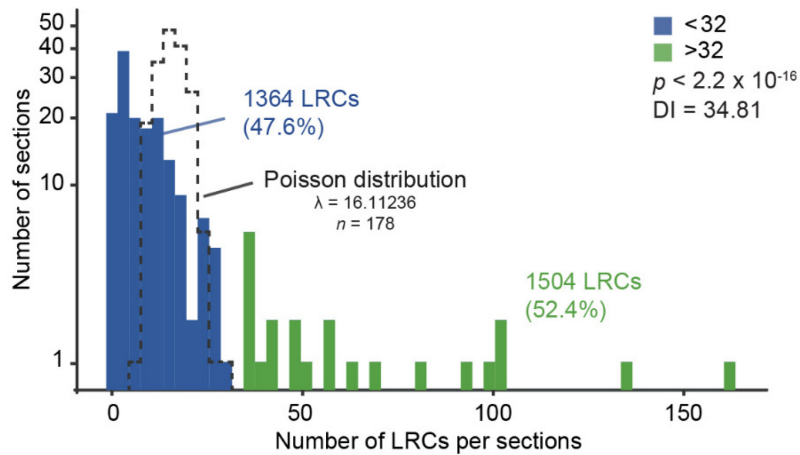


Figure 3.2 | LRCs are found in clusters at the CMJ

(A) Representative images of LRC clusters near the CMJ. Cytokeratin K5 is shown in red, K8 in blue and H2B-GFP in green. (b) LRC distribution in the thymus. Each thymic slice was divided in 40-50 sections (see Supplementary Fig. S2.3B, Annex II, p. x) for LRC quantification. Histogram shows the number of sections on the Y-axis (projected on a log scale) and the number of LRCs per section on the X-axis. The TEC distribution did not fit a Poisson distribution, shown with a black dotted line ($p < 2.2 \times 10^{-16}$; goodness of fit, maximum likelihood).

created with the LRCs

distribution's average ($\lambda = 16.11236$) and containing the same number of values ($k = 178$) and confirmed that the distributions were significantly different ($p < 2.2 \times 10^{-16}$; goodness of fit). We then calculated the dispersion index associated with LRCs' distribution. In a context where the positions of events would be completely independent of one another,

the dispersion index would be equal to 1, as represented by the Poisson distribution. In a non-randomly dispersed dataset, a dispersion index > 1 means that the events tend to group together, leaving empty spaces in-between clusters of events. On the opposite, a dispersion index < 1 corresponds to a pattern of organization more regular than the randomness associated with the Poisson distribution. The dispersion index of LRCs in thymic slices was 34.81, showing that LRCs were grouped in clusters (Figure 3.2B, p.72). Together, these results show that most LRCs present an undifferentiated phenotype and are found in clusters at the CMJ, suggesting the existence of a specialized microenvironment (niche) for these quiescent cells.

3.4.4.3 UEA1– LRCs increase their proliferation rate following acute thymic injury

We studied TEC proliferation using bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation. It must be reminded that upon division, the H2B-GFP content in LRCs decreases by 50% in the daughter cells, and therefore LRCs' progeny might become GFPint. Consequently, we reasoned that cells derived from LRCs which had undergone one or two cell divisions would be BrdU+ and either GFPhi or GFPint (regrouped under GFP+ in Figure 3.3, p.74). This definition may slightly underestimate the LRC progeny because after three cell divisions, the LRC progeny would become

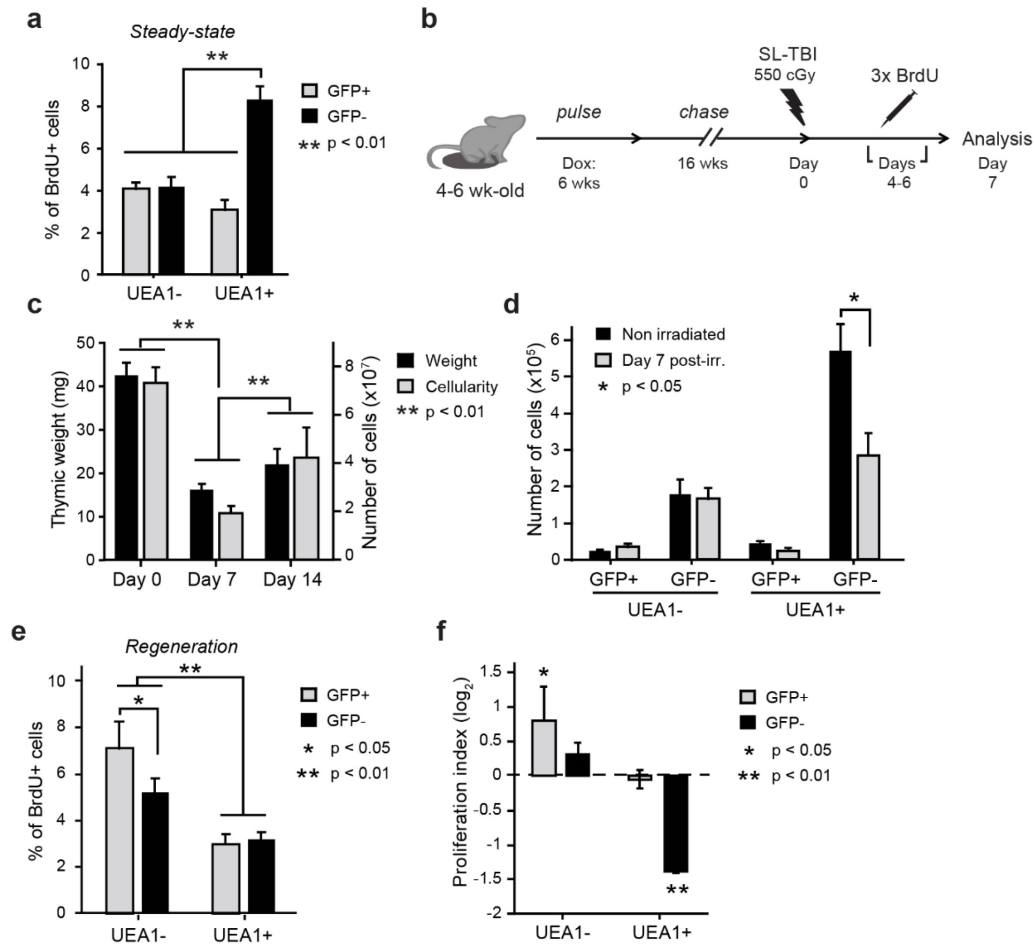


Figure 3.3 | UEA1- LRCs participate to thymic regeneration following SL-TBI

(A) Percentage of BrdU+ TECs under steady-state conditions. Statistical differences were calculated using paired Student t test ($n = 10$). (B) Schematic representation of the thymic injury assay. (C) Thymic weight (black) and cellularity (gray) at different times before and after irradiation ($n = 4$ to 11 per group). (D) Number of cells in each TEC subset in non-irradiated controls (Day 0, black) and during regeneration following SL-TBI (Day 7, gray, $n = 5$). Percentage of BrdU+ TECs (E) and proliferation index (F) for each subpopulation of TECs during thymic regeneration. The proliferation index is calculated using the following equation: proportion of BrdU+ cells during regeneration (day 7) / proportion of BrdU+ cells prior to SL-TBI (day 0). Cells derived from LRCs (labelled GFP+) or NonLRCs (labelled GFP-) are represented in gray and black, respectively ($n = 9$ to 10 per group). Statistical differences for C, D and F were calculated by cell population, comparing day 0 non-irradiated to day 7 post-irradiation or day 14 to day 7 post-irradiation. Data are represented as mean + SEM.

GFP⁻ in tissue sections (through dilution). To minimize this bias, we allowed BrdU incorporation during only a short pulse period of three days, starting at the end of the 16-week H2B-GFP chase period. Thymi were then extracted on the following day and analyzed for BrdU incorporation. Under steady-state conditions, most BrdU⁺ TECs derived from UEA1⁺ NonLRCs (labelled GFP⁻ in Figure 3.3, p.74). This is consistent with previous reports that mTECs (UEA1⁺) proliferate more extensively than other TEC subsets in adult mice^{181,302}.

We next assessed TEC regeneration following acute thymic injury, using the well characterized model of sublethal-total body irradiation (SL-TBI) without hematopoietic rescue. SL-TBI induces an acute thymic involution and thymic weight reaches a nadir 3 days after irradiation^{181,235,305}. This involution phase is followed by a regenerative phase as thymic cellularity returns to normal levels within a few weeks. At the end of the H2B-GFP chase period (i.e., at 26-28 weeks of age), mice were irradiated on “day 0” with a sublethal dose of 550 cGy (Figure 3.3B, p.74). As expected, we observed global thymic hypocellularity 7 days after SL-TBI, followed by regeneration between day 7 and 14 (Figure 3.3C, p.74). Consistent with the notion that actively cycling cells are particularly sensitive to irradiation³⁰⁶, the decrease in TEC numbers on day 7 post-SL-TBI was due exclusively to the loss of UEA1⁺ GFP⁻ NonLRCs (Figure 3.3D, p.74).

To monitor TEC proliferation at the onset of thymic regeneration, mice were given daily intraperitoneal injections of BrdU from day 4 to day 6 after SL-TBI (Figure 3.3B, p.74), i.e. during the first days of thymic regrowth^{234,235,305}, and the percentage of BrdU⁺ cells was assessed at day 7 (Figure 3.3E, p.74). While BrdU incorporation can occur through both DNA repair and DNA replication, the amount of BrdU incorporated during those two events is very different, as DNA repair occurs in localized foci in the genome³⁰⁷. The median fluorescence intensity (MFI) of BrdU⁺ TECs was more than 7x that of the whole cell population for both non-irradiated controls and day 7 post-irradiation

(Supplementary Fig. S2.4, Annex II, p. xi), showing that BrdU incorporation after irradiation truly results from DNA replication. Also, BrdU MFI higher than that of BrdU+ TECs in the non-irradiated control (Supplementary Fig. S2.4, Annex II, p. xi), suggesting that cells proliferating after irradiation went through more cycles of proliferation than those proliferating in steady-state. Interestingly, when compared to steady-state conditions (Figure 3.3A, p.74), the proportion of BrdU+ cells during post-SL-TBI regeneration showed conspicuous changes in two TEC subsets. Firstly, the frequency of BrdU+ cells among UEA1+ NonLRCs (GFP-) was decreased by more than 2-fold (Figures 3.3E and F, p.74). Secondly, the salient finding was a conspicuous increase in the proportion of BrdU+ UEA1- LRCs which surpassed the proportion of BrdU+ elements in all other TEC subsets (Figures 3.3E and F, p.74). Overall, these results show that i) UEA1+ NonLRCs, are greatly affected by irradiation, resulting in cell death and decreased proliferation, and ii) that UEA1- LRCs enrich for radioresistant TEPCs that actively proliferate during tissue regrowth.

3.4.4.4 Cell surface phenotype of UEA1- LRCs

Recent studies have reported the presence of bipotent TEPCs in the adult thymus. However, the cell surface phenotype of bipotent TEPCs in these three reports showed significant discrepancies^{83,84,307}. We therefore assessed whether UEA1- LRCs expressed cell surface markers previously reported in bipotent TEPCs (Supplementary Table S2.2, Annex II, p. xii). When compared to UEA1- NonLRCs, UEA1- LRCs showed increased proportion of MHCII^{lo}, Sca1^{hi}, Cd49^{fhi} and Ly51+ elements (Figure 3.4, p.77). Furthermore, UEA1- LRCs were EpCAM+ (Supplementary Fig. S2.2, Annex II, p. ix) and Plet1- (Figure 3.4B, p.77). Therefore, the phenotype of UEA1- LRCs is remarkably similar to that of TEPCs reported by Wong et al. which were EpCAM+ UEA1- MHCII^{lo} Sca1^{hi} and CD49^{fhi} Plet1-³⁰⁷.

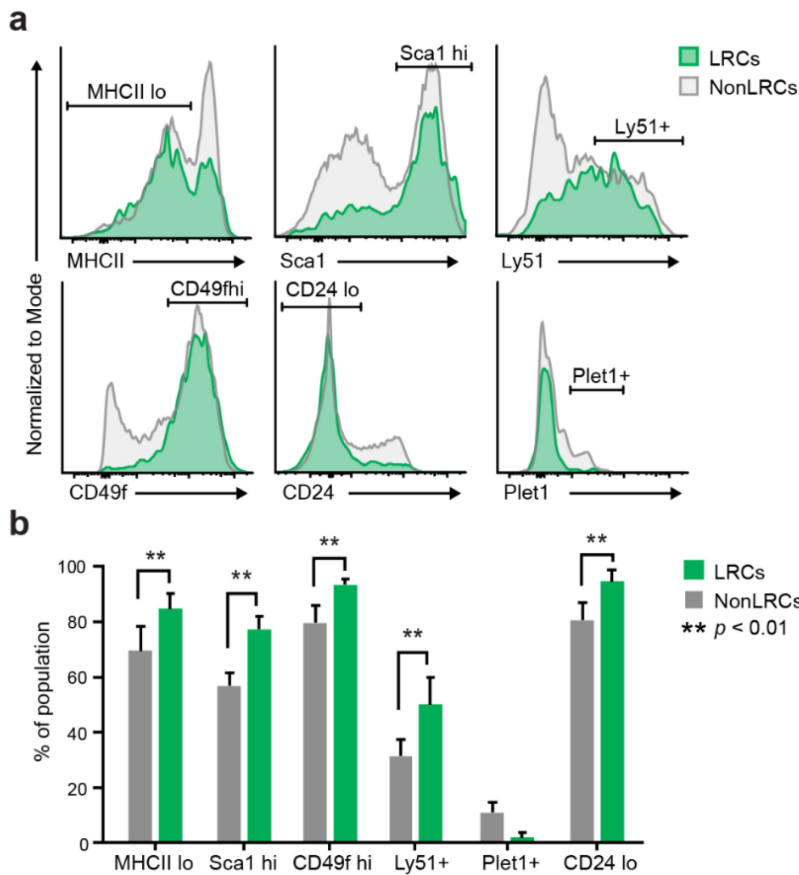


Figure 3.4 | Cell surface markers of UEA1- LRCs

(A) Representative expression of cell surface markers on UEA1- TECs. LRCs are represented in green and NonLRCs in gray. (B) Proportion of UEA1- LRCs and NonLRCs displaying specified phenotypes (n = 2 to 9 per marker).

of UEA1- LRCs and NonLRCs

To gain insights into the molecular and functional attributes of UEA1- LRCs (enriched in radioresistant TEPCs), we compared their transcriptome to that of UEA1- NonLRCs. To this end, we extracted and sequenced poly-A enriched mRNAs from sorted UEA1- LRCs and NonLRCs using the Illumina HiSeq2000 platform. A total of 2,078 genes showed differential expression (fold-change > 2) between UEA1- LRCs and NonLRCs, of which 1,450 (69.8%) were downregulated in UEA1- LRCs. We then analyzed gene ontology (GO)-term enrichment for each of the top 500 most differentially expressed genes. Using the gene-annotation enrichment tool DAVID^{308,309}, we extracted GO-terms for each cell population and used the REVIGO software to reduce GO-terms redundancy.

Four GO-terms associated with the regulation of thymocytes maturation by TECs were significantly enriched in the gene set upregulated in UEA1- NonLRCs (Figure 3.5,

p.78). Notably, genes involved in antigen presentation (*Lrmp* and *H2-q7*) and thymocyte stimulation (*Cd86*, *Il10* and *Il12a*) and chemotaxis (*Ccl22* and *Pbbp*) were upregulated in NonLRCs (Figure 3.5B, p.78)^{85,310,311}. Moreover, many chemokines involved in the chemotaxis of dendritic cells and macrophages (*Ccl2*, *Ccl5*, *Ccl8*, *Cxcl3*, *Cxcl5* and *Cxcl17*) were also upregulated in UEA1- NonLRCs^{312,313}. These results suggest that UEA1- NonLRCs are better equipped than UEA1- LRCs to interact with hematopoietic cells.

On the other hand, several genes upregulated in UEA1- LRCs were associated with cell adhesion and cell migration (Figures 3.6A and B, p.79), including many secreted extracellular

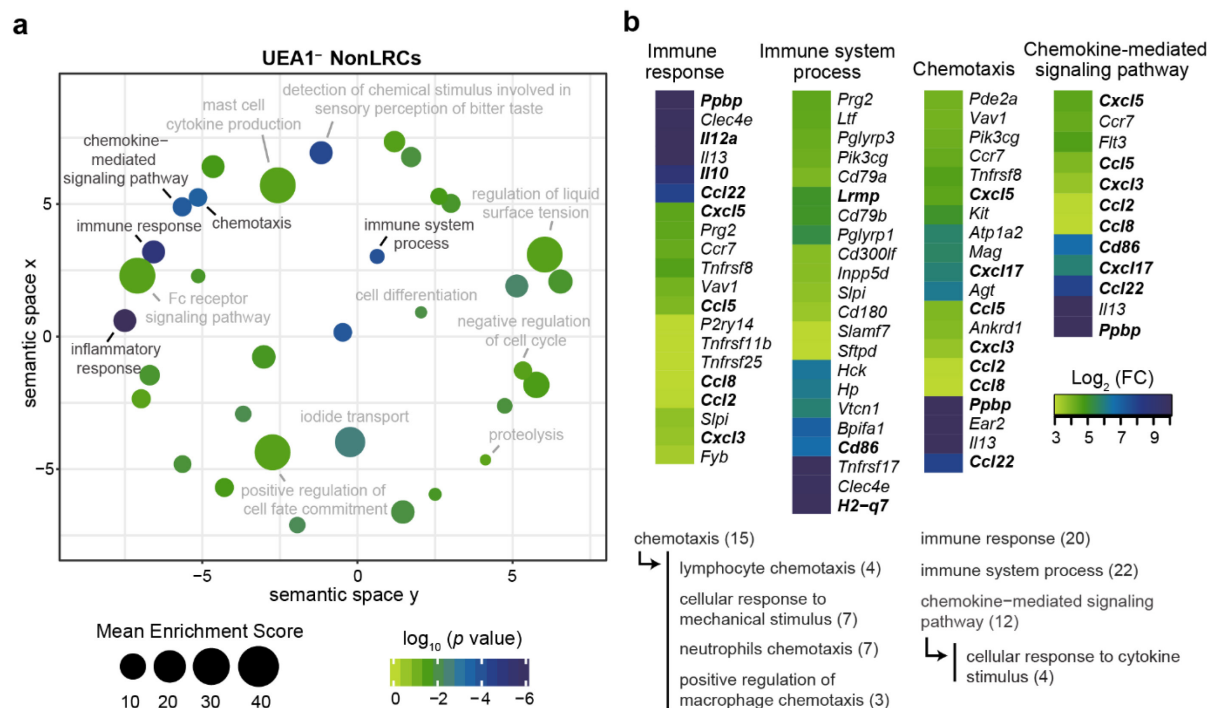


Figure 3.5 | UEA1- NonLRCs are well adapted to communicate with hematopoietic cells

(A) REVIGO graphical representation of significant GO-term enrichment for genes expressed at higher level in UEA1- NonLRCs than UEA1- LRCs. The position of GO-terms represents their semantic similarities calculated by REVIGO, the size represents the mean enrichment score of the GO-terms contained in each point and the color indicates the *p* value for that particular GO-term.

(B) Heatmap showing the differential expression of genes involved in GO-terms related to interactions with hematopoietic cells. All GO-terms are determined using DAVID online bioinformatic gene enrichment tool from the top 500 genes expressed at higher level in UEA1-NonLRCs than UEA1- LRCs. Semantic relations between GO-terms of interest are shown below, and the number of genes per GO-term is shown in parentheses.

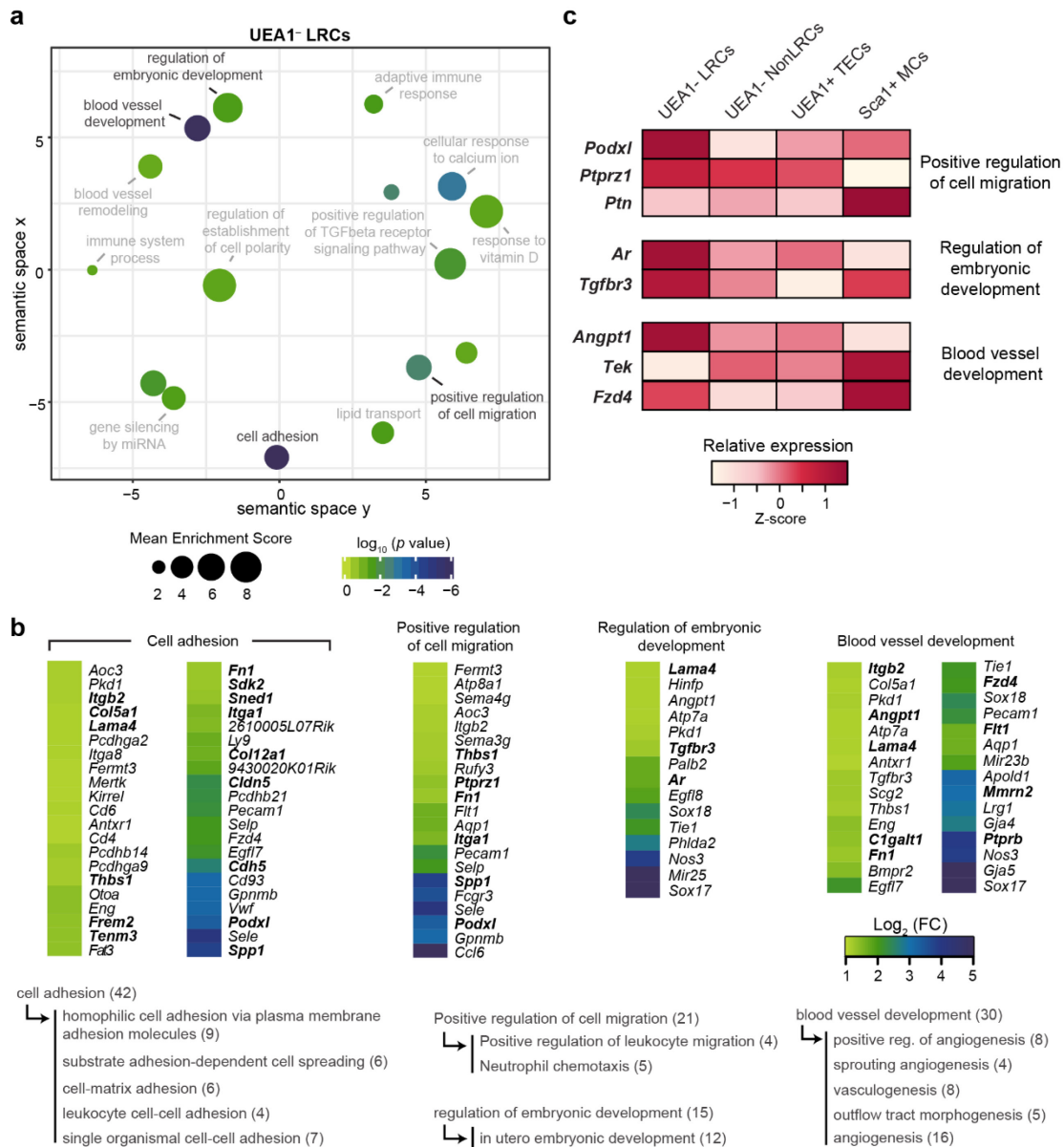


Figure 3.6 | Transcriptomic analysis of UEA1- LRCs reveals potential regulators of TEPs

(A) REViGO graphical representation of semantic relations between GO-terms related to the top 500 genes expressed at higher level in UEA1- LRCs than UEA1- NonLRCs. The position of GO-terms represents their semantic similarities calculated by REViGO, the size represents the mean enrichment score of the GO-terms contained in each point and the color indicates the *p* value. (B) Heatmap showing the differential expression of genes responsible for GO-term enrichment in panel a. Semantic relations between GO-terms are shown below, with the number of genes shown in parenthesis. (C) Relative expression (Z-score) of potential regulators of TEPCs in thymic stromal cell subsets.

matrix (ECM) proteins (*Col12a1*, *Col5a1*, *Fn1*, *Frem2*, *Lama4* and *Sned1*) and molecules involved in cell-cell or cell-matrix adhesion (*Cldn5*, *Cdh5*, *Itga1*, *Itgb2*, *Sdk2*, *Tenm3* and *Thbs1*). Contrary to UEA1- NonLRCs, UEA1- LRCs therefore seemed more adapted to interact with the surrounding stromal cells and ECM. Two genes specifically upregulated in UEA1- LRCs are involved in the regulation of stem cell activity in several tissues: *Podxl* and *Ptprz1* (Figure 3.6C, p.79). *Podxl*, a marker of cardiac, hematopoietic and mesenchymal stem cells, is involved in the maintenance of the immature state in cardiac stem cells and its downregulation facilitates their differentiation^{314–316}. *Ptprz1* is expressed in human embryonic stem cells and is downregulated during differentiation. While PTPRZ1 depletion is associated with a decrease in colony-formation potential of embryonic stem cells, its activation enhances the proliferation of embryonic stem cells³¹⁷. PTPRZ1 also negatively regulates oligodendrocyte precursor proliferation³¹⁸. Interestingly, the *Ptprz1* ligand *Ptn*, expressed by fibroblasts in the embryo, is also highly expressed by Sca1+ thymic mesenchymal cells (Figure 3.6C, p.79) but absent in TECs. The expression profile of *Ptprz1* (by UEA1- LRCs) and *Ptn* (by Sca1+ mesenchymal cells) suggests that Sca1+ mesenchymal cells may be key components of the TEPC niche, as observed in other tissues³¹⁹. From these results, we conclude that *Podxl* and *Ptprz1* represent potential regulators of TEPC maintenance via interactions with stromal niche components.

Another GO-term significantly enriched in UEA1– LRCs is directly related to stem cell regulation: regulation of embryonic development (Figures 3.6A and B, p.79). Two pathways associated with this GO-term are also known to regulate thymopoiesis: androgen receptor and TGF-beta. Androgen receptor is expressed by TECs and regulates their proliferation. Indeed, administration or ablation of androgen respectively lead to acute thymic involution and hypertrophy^{142,153,156,320}. Of note, expression of androgen receptors by stromal cells is necessary for androgens to affect thymic cellularity^{153,154,320}. The fact that UEA1– LRCs express higher levels of *Ar* transcripts than other types of thymic stromal cells (Figure 3.6C, p.79) suggests that the impact of androgens on thymopoiesis could be mediated primarily via regulation of TEPCs. In addition, TGF-beta signaling in TECs was previously shown to decrease mTEC differentiation and maturation¹⁵². Hence, though the precise role of TGFBR3 in TECs has not been elucidated, its higher expression in UEA1– LRCs suggests that it might regulate their activity or differentiation (Figure 3.6C, p.79).

Typically, stem cells preferentially reside close to blood vessels in many tissues, including the bone marrow, hair follicle bulge and testes^{187,321,322}. Interestingly, the GO-term blood vessel development showed a very significant enrichment in UEA1– LRCs ($p < 10^{-7}$, Figures 3.6A and B, p.79) and several genes overexpressed in UEA1– LRCs regulate blood vessel stability (*Angpt1*, *Ptprb*, *C1galt1*, *Lama4*, *Mmrn2* and *Flt1*). Interestingly, in addition to its implication in blood vessel development *Angpt1* is also involved in hematopoietic stem cell maintenance. Hematopoietic stem cells express high levels of ANGPT1, and TEK-ANGPT1 signaling facilitates adhesion of hematopoietic stem cells to their niche, increasing their stem cell activity³²³. Of note, thymic Sca1+ mesenchymal cells also express high levels of *Tek*, the ligand for ANGPT1 (Figure 3.6C, p.79), suggesting that TEK-ANGPT1 interaction might also be involved in the maintenance of TEPCs. Finally, the WNT4 receptor *Fzd4* was expressed at higher levels in UEA1– LRCs and Sca1+

mesenchymal cells compared to other stromal populations (Figure 3.6C, p.79). As WNT4 signaling enhances thymic cellularity through the expansion of TECs³²⁴ and decreased WNT4 production contributes to thymic involution⁹², expression of *Fzd4* by the TEPC-enriched population of UEA1– LRCs and by Sca1+ mesenchymal cells suggest that WNT4 may regulate TEC maintenance primarily by regulating these two cell populations. Overall, our transcriptomic analyses suggest that while UEA1– NonLRCs are specialized to communicate with hematolymphoid cells, UEA1– LRCs interact mostly with the surrounding stromal cells and ECM. Furthermore, we have identified through transcriptomic sequencing six potential regulators of TEPCs (*Podxl*, *Ptprz1*, *Ar*, *Tgfb3*, *Angpt1*, *Fzd4*) that are upregulated in UEA1– LRCs.

3.4.5 Discussion

In a previous study, we have demonstrated the presence of non-senescent LRCs in UEA1⁻ TECs¹⁸¹. We now report that, together with their quiescent state, their resistance to radiations and their undifferentiated phenotype (K5+K8+) the ability of UEA1⁻ LRCs to participate to TEC regeneration after acute injury qualifies them as TEPCs. This conclusion is strengthened by two features of our experimental design. First, because of the constraints of the label-retention assay, our analyses on UEA1⁻ LRCs were performed in mice that were quite old, at 26-28 weeks of age. At this age, one would expect the global TEC population to have a limited proliferation potential. Indeed, previous studies of TEPCs were performed either in newborns or in 6-8 weeks old mice⁸³⁻⁸⁵. Second, we analyzed the proliferation of UEA1⁻ LRCs *in situ*, without transplantation nor any *in vitro* purification step or culture. It has been shown that cells which are extracted from their normal environment and transplanted can acquire stem cell properties that they do not display under steady-state conditions^{297,325}. We therefore conclude that even in relatively old mice, UEA1⁻ LRCs have genuine TEPC activity after acute involution. During the regenerative phase following acute thymic injury induced by SL-TBI, UEA1⁻ LRCs were the most actively proliferating TEC subset. Interestingly, while the UEA1⁻ LRCs did not proliferate much under steady-state conditions, they increased their proliferation in the context of tissue repair. On the other hand, the TECs which proliferate most under steady-state conditions, i.e. UEA1⁺ NonLRCs, are the most affected by irradiation and barely proliferate during thymic regeneration. Of note, in addition to cell-intrinsic features (i.e., high percentage of cycling elements), the exquisite sensitivity of thymic UEA1⁺ NonLRCs to acute injury may be in part cell-extrinsic. Indeed, thymocyte-TEC crosstalk is involved in thymic regeneration following total body irradiation³²⁶. As irradiation leads to the depletion of thymocytes, it might disrupt interactions that allowed sustained proliferation and survival in mTECs. As UEA1⁻ LRCs express lower levels of genes

involved in TEC-thymocyte interactions (Figure 3.6, p.79), they might be less dependent on crosstalk with thymocytes. Our observations on TEC turnover are reminiscent of the intestinal epithelium which possesses two types of stem cells: i) rapidly-cycling LGR5+ stem cell, responsible for steady-state maintenance of the intestinal epithelium, and ii) a pool of reserve quiescent stem cells that can compensate when the rapidly-cycling LGR5+ stem cells are damaged³²⁷. Our data suggest that UEA1- LRCs are similar to the reserve quiescent stem cells in the intestinal epithelium. Likewise, other tissues including the cornea and the bone marrow contain quiescent stem cells that can be called upon in a context of injury^{325,327-329}.

UEA1- LRCs shared two features with the bipotent progenitors identified by Wong *et al* (2014): they display similar cell surface phenotypes and are both label-retaining cells⁸³. This suggests that UEA1- LRCs might contribute to the regeneration of both cTECs and mTECs following irradiation-induced injury. However, Ohigashi *et al* (2015) reported that in adults, cTECs and mTECs were maintained by distinct progenitors, distinguished by their expression of the $\beta 5T$ immunoproteasome subunit⁷⁸. Therefore, it is also possible that UEA1- LRCs contribute only to the regeneration of cTECs. Our model unfortunately has limitations, inherent to the nature of the label-retention assay, which prevents us to fully explore these hypotheses. First, UEA1- LRCs were enriched in TEPCs but they did not represent a pure TEPC population. Second, label retention assays do not allow to perform *in situ* lineage tracing of LRCs in order to precisely characterize their differentiation potential. Pure quiescent TEPC populations and lineage tracing assays will be necessary to properly address these issues, which will require discovery and validation of new quiescent TEPC-specific markers.

Nevertheless, in addition to the identification of TEPCs in UEA1- LRCs, our work i) shows that most UEA1- LRCs are found in clusters in the vicinity of the CMJ, and ii) presents a systems-level transcriptomic analysis of this TEPC-enriched cell subset.

Moreover, RNA-Seq analyses revealed several interesting features of UEA1– LRCs. Based on their transcriptome, UEA1– NonLRCs would appear more qualified to interact with thymocytes whereas UEA1– LRCs seem more adapted to interactions with stromal cells and the ECM. These findings, together with evidence that UEA1– LRCs are preferentially located in clusters in the CMR, suggest the existence of a specialized niche for TEPCs. More specifically, we identified three genes that may play a role in the regulation of TEPCs through interactions with niche cells: *Ptprz1*, *Podxl* and *Angpt1*. In particular, the expression of the *Ptprz1* ligand *Ptn* by Sca1+ mesenchymal cells suggest that these cells are important components of the TEPC niche, as they are for the hematopoietic stem cell niche³¹⁹. Furthermore, many genes involved in blood vessel development were upregulated in UEA1– LRCs compared to NonLRCs. This observation is coherent with the fact that blood vessels are crucial components of many types of stem/progenitor cell niches³³⁰. Finally, among genes expressed at higher levels in UEA1– LRCs than in UEA1– NonLRCs, we identified three receptors whose ligands regulate TEC homeostasis: *Ar*, *Fzd4* and *Tgfrb3*. Identification of these potential TEPC regulators warrants further investigation in order to better understand the mechanisms regulating the function of TEPCs and their interactions with niche cells. Investigations along these lines could provide evidence-based strategies for enhancing TEC regeneration.

3.4.3 Materials and methods

3.4.3.1 Mice

B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm1(rtTA*M2)Jae/J and STOCK Tg(tetO-HIST1H2BJ/GFP)47Efu/J mice purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor) were bred and housed under specific-pathogen-free conditions in sterile ventilated racks at the Institute for Research in Immunology and Cancer. For H2B-GFP pulse-chase experiments, doxycycline was incorporated in food (2 g/kg) (Hartlan Laboratories), or in drinking water (2 mg/ml of doxycycline supplemented with 5% sucrose) for a 6-week pulse period. Only female mice were analyzed in this study. All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Comité de Déontologie et Expérimentation Animale de l'Université de Montréal.

3.4.3.2 Thymic stroma digestion

Enrichment of thymic stromal cells was performed as previously described³³¹. Briefly, thymic tissue was cut into small fragments and thymocytes released were removed from the supernatant. Stromal fragments were then digested at 37°C using a solution of 0.01% Liberase TM (Roche Applied Science) and 0.1% DNase-1 (Sigma-Aldrich) in RPMI-1640 with HEPES (Gibco) for 3 periods of 15 minutes. After the second incubation, cells released in the supernatant were removed and placed on ice and new fresh enzyme solution was added to the remaining fragments. The stromal cells in suspension were filtered before staining and analysis.

3.4.3.3 Flow cytometry and immunofluorescence microscopy

The list of antibodies is provided in Supplementary Experimental Procedures (Supplementary Table S2.1, Annex II, p. vii). Viability of cells was assessed using 7-AAD

or Propidium Iodine (BD Biosciences). Cell sorting was performed using three laser FACSria (BD Biosciences) or analyzed on a three laser LSR II (BD Biosciences) using FACSDiva software (BD Biosciences).

Immunofluorescence microscopy was performed on cryosections of female thymi extracted after a 16-week chase period. Appropriate isotype and negative controls were included in all experiments. For detection of immunofluorescence, slices were examined using the Nanozoomer 2.0-HT from Hamamatsu and NDPscan software (Hamamatsu) was used for image analysis. Quantification of K5+, K8+ or K5+K8+ surface area was performed using ImageJ, and LRCs were identified as having fluorescence intensity four times that of the cells in the negative controls with the maximal fluorescence intensity (see Supplementary Fig. S2.1, Annex II, p. viii).

3.4.3.4 Thymic injury and BrdU incorporation

Female mice at 16 weeks of chase were irradiated at a sublethal dose of 550 cGy to induce thymic involution (day 0). Four days after the irradiation, intraperitoneal injections of BrdU (1.5 mg per injection) were given daily for 3 days (days 4 to 6). At day 7, the mice were sacrificed and the thymus was extracted for analysis. For control mice, the same procedure was performed without irradiation, at the end of the chase period.

3.4.3.5 Statistical analyses

Unless stated otherwise, results are expressed as means \pm SD and statistical significance was assessed using unpaired two-tailed Student t test. We verified the goodness of fit to the Poisson distribution using maximum likelihood to assess the statistical significance of dispersion index, calculated from the location of LRCs on thymic slices.

3.4.3.6 RNA-sequencing

We analyzed the transcriptome of two populations of TECs: UEA1– LRCs (GFPhi) and UEA1– NonLRCs (GFP–) from females after a 6-week pulse period and a 16-week chase period. We obtained one biological replicates of each TEC population from a pool of 11 mice to get a minimum of 10^4 cells per sample. Total RNA was isolated using Trizol™ as recommended by the manufacturer (Invitrogen), and then further purified using RNeasy Micro columns (Qiagen). Sample quality was assessed using Bioanalyzer RNA Pico chips (Agilent). Transcriptome libraries were made using the TruSeq RNA Sample Prep Kit (v2) (Illumina) following the manufacturer's protocols. Library generation was then assessed using a Bioanalyzer platform (Agilent) and Illumina MiSeq-QC run. Then, sequencing was done using Illumina HiSeq2000 and TruSeq SBS v3 chemistry at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Genomics Platform. Cluster density was targeted at around 800 k clusters/mm². Data was mapped to the *Mus musculus* (mm10) reference genome using the ELANDv2 alignment tool from the CASAVA 1.8.2 software (Illumina). RNA-seq data have been deposited in GEO archives under accession number GSE94642 and are displayed in Supplementary Table S3 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE94642>). Analyses of RNA sequencing data were performed using the publicly available statistical software package “R” (<http://www.r-project.org/>). To remove genes that were lowly expressed in our analysis, we considered only genes that had a relative expression higher than 1 RPKM in at least one sample. Enrichment of biological functions were performed using the Gene Functional Annotation tool from DAVID bioinformatics resources (<https://david.ncifcrf.gov/>, version 6.8)^{308,309}, and reduction of redundancy through semantic similarity was performed using REVIGO web-based tool for gene ontology analysis³³².

RNA-Seq data for Sca1+ mesenchymal cells and for UEA1+ TECs from female mice depicted in Figure 3.6 (p.79) were extracted from Patenaude and Perreault (2016) and Dumont-Lagacé et al. (2015), respectively^{302,319}. Data can be found under GEO accession numbers GSE60101 and GSE66873.

3.4.6 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

3.4.7 Authors contributions

MDL: conception and design, collection, assembly, analysis and interpretation of data, manuscript writing. HG: conception and design, collection and assembly of data, final revisions of the manuscript. TD, JPL, SB and SL: analysis and interpretation of data, final revisions of the manuscript. EG: conception and design, manuscript writing. CP: conception and design, provision of study material, financial support and manuscript writing.

3.4.8 Funding

This work was supported by grant FDN-148400 from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). MDL is supported by a CIHR studentship and CP holds a Canada Research Chair in Immunobiology. The Institute for Research in Immunology and Cancer is supported in part by the Canada Foundation for Innovation and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

3.4.9 Acknowledgments

We are grateful to Danielle Gagné and Gaël Dulude for flow cytometry and cell sorting, Jennifer Huber for RNA-sequencing experiments and Isabelle Caron and Marie-Pierre Hardy for help with the thymic injury experiments and BrdU injections. Special

thanks to Jarrod A. Dudakov for the insights on irradiation-induced thymic injury and for his advice on the design of this experiment.

3.4.10 Additional information

Supplementary information includes a table containing the list of antibodies used in this study, 3 Figures and a Table comparing the cell surface phenotype of UEA1– LRCs to that of TEPCs identified in other reports. Quantification of gene expression by RNA-sequencing is provided in a distinct Excel file.

Chapitre 4 - Régénération thymique postpartum

4.1 Résumé

Le thymus subit chez la femelle une involution thymique temporaire pendant la grossesse. Cette involution, caractérisée par une diminution de 70% de la masse du thymus, mène à une production réduite de cellules T pendant la gestation et est importante pour la fertilité. Après l'accouchement, le thymus croît à nouveau pour retrouver une cellularité normale. Jusqu'à ce jour, nos connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant la régénération thymique postpartum demeurent limitées. Comme la régulation de la thymopoïèse est effectuée par les TEC, nous avons voulu savoir quels changements séquentiels se produisaient dans les TEC pendant la régénération postpartum. Pour ce faire, nous avons étudié le phénotype et le transcriptome des cTEC et mTEC à 16 temps d'analyse, dont 14 après l'accouchement, afin d'étudier le profil des TEC pendant toute la cinétique de régénération thymique. Dans un premier temps, nous montrons que le déclenchement de la régénération thymique n'est pas associé à une expansion cellulaire de l'épithélium thymique, mais implique plutôt des changements phénotypiques chez les cTEC, entre autres la surexpression de *Foxn1* et de ces cibles. Enfin, nos résultats suggèrent que *Klf4* pourrait agir comme effecteur de la signalisation hormonale menant à l'inhibition de *Foxn1* lors de l'involution thymique pendant la grossesse, mais aussi reliée à l'âge. L'expression de *Klf4* est inhibée pendant la régénération thymique, ce qui pourrait rétablir l'expression de *Foxn1* en période postpartum, induisant la croissance du thymus.

4.2 Introduction au projet

L'involution thymique induite pendant la grossesse est caractérisée par une diminution importante de la masse et de la cellularité de thymus. Cette diminution affecte toutes les populations lymphocytaires du thymus, des thymocytes double négatifs (CD4-CD8-, appelés DN), double positifs (CD4+CD8+, appelés DP), aux thymocytes simples positifs (CD4+CD8-, ou SP4 et CD4-CD8+ ou SP8)^{150,333}. Ce phénomène d'involution aiguë n'est pas causée par l'apoptose massive des DP, mais plutôt par un arrêt de la prolifération et de la différenciation des thymocytes pendant la grossesse¹⁵⁰. Le blocage de la différenciation des thymocytes semble survenir à un stade très précoce, entre DN1 et DN2, puisqu'à la fin de la période de gestation, le thymus contient une proportion élevée de DN1 (CD44+CD25-)³³⁴.

Cette involution pendant la grossesse est induite par les hormones sexuelles produites pendant la grossesse, soit les estrogènes et la progestérone¹⁵¹. Cependant, il semble que l'effet des hormones ne soit pas médié directement sur les thymocytes, mais plutôt par un intermédiaire stromal. En effet, l'involution induite par la grossesse nécessite l'expression du récepteur de la progestérone (PGR) dans le stroma thymique, mais pas dans les cellules lymphoïdes¹⁴⁹. Ceci suggère que la niche stromale permettant le développement et la survie des thymocytes est altérée par la progestérone pendant la grossesse. Récemment, Laan *et al* (2016) ont démontré que plusieurs gènes impliqués dans le développement des thymocytes étaient sous-exprimés pendant la gestation³³⁴ : (1) *Ccl25*, *Ccl21/19* et *Cxcl12*, respectivement ligands des récepteurs CCR9, CCR7 et CXCR4 exprimés par les précurseurs des thymocytes et nécessaires pour leur migration dans le thymus, (2) interleukine-7 (*Il7*) et *Kitl*, des cytokines essentielles à l'expansion des thymocytes^{230,335,336} et (3) *Dll4*, ligand de Notch1 essentiel pour la différenciation vers la lignée T^{11,337}. Comme le thymus se régénère après l'accouchement, l'involution pendant la grossesse est donc temporaire.

La plupart des études s'étant concentrée sur les mécanismes induisant l'involution thymique, nos connaissances sur les mécanismes permettant la régénération thymique postpartum sont limitées. Plusieurs études ont démontré que l'allaitement retarde la régénération postpartum³³³. Comme les niveaux de progestérones diminuent après l'accouchement, cela indique que le mécanisme prévenant la régénération est différent de celui induisant l'involution. D'autres facteurs, comme la prolactine, pourraient être en cause, puisque le taux de régénération thymique corrèle négativement avec le nombre de souriceaux et de mamelles fonctionnelles³³³. Sans allaitement, le thymus retrouve une taille normale 2 à 3 semaines postpartum, avec des proportions normales des populations de thymocytes^{333,338}.

Quelques études récentes ont pu identifier des facteurs importants dans d'autres modèles de régénération thymique chez l'adulte. Bredenkamp *et al* (2014) ont démontré que la surexpression du facteur de transcription *Foxn1*, régulateur clé dans la différenciation des TEC et dans l'expression de gènes essentiels à la thymopoïèse, chez les TEC était suffisante pour induire la régénération d'un thymus fortement involué chez des souris âgées (12 et 24 mois)²⁰⁸. Wertheimer *et al* (2018) ont quant à eux démontré que la production de BMP4 par les cellules endothéliales du thymus favorisait la régénération thymique suite à une irradiation sub-létale. D'ailleurs, BMP4 agit sur les TEC en induisant l'expression de *Foxn1* et de ces cibles transcriptionnelles²⁴⁸. Nous ignorons toutefois si ces mêmes mécanismes jouent un rôle dans la régénération postpartum.

Dans la présente étude, nous montrons que l'involution thymique associée à la grossesse n'est pas liée à une perte cellulaire dans l'épithélium thymique, mais est plutôt provoquée par des changements transcriptomiques et phénotypiques, et ce, principalement chez les cTEC. La surexpression de *Foxn1* et de ses cibles par les cTEC est impliquée dans la régénération thymique postpartum. Cependant, aucune activation de la signalisation par les récepteurs pour BMP4 n'est observée, montrant que le mécanisme

de régénération thymique postpartum diffère de celui suivant une involution induite par irradiation sub-létale²⁴⁸. Enfin, nos résultats suggèrent que *Klf4* agit comme effecteur de la signalisation hormonale dans l'induction de l'involution thymique pendant la grossesse, entre autres par l'inhibition de l'expression de *Foxn1*.

4.3 Résultats

4.3.1 L'épithélium thymique ne subit pas de pertes cellulaires pendant la grossesse

Il a été montré que l'involution thymique induite par la grossesse causait une accumulation relative des DN1 par blocage de leur différenciation et de leur prolifération, sans provoquer une apoptose accrue des thymocytes^{150,334}. Conformément aux résultats de Laan *et al* (2016), nos résultats montrent que toutes les populations de thymocytes sont diminuées en nombre pendant la grossesse (Figure 4.1A, p.97). On observe également une accumulation relative des DN1, qui persiste jusqu'au jour 3 postpartum (J3) (Figure 4.1B, p.97). Cependant, dès J3, on observe une augmentation des proportions de DN2 et de DN3, ce qui suggère que leur processus de différenciation est recommencé. Entre J3 et J6, le pourcentage de DN1 revient à la normale, et la proportion de DN4, le nombre de DP et la masse et la cellularité totale du thymus augmentent (Figure 4.1C, p.97). Aux jours J16 à J28, le thymus montre une hypertrophie (masse et cellularité en moyenne 1.3 et 1.5x plus élevée que le contrôle NG respectivement), probablement due au nombre élevé de DP qui représentent la grande majorité des cellules du thymus (Figure 4.1A, p.97). De plus, les SP4 augmentent en nombre beaucoup plus rapidement que les SP8 dès J12 (Figure 4.1A, p.97).

Comme les populations de thymocytes subissent d'importantes pertes cellulaires pendant la grossesse, nous avons voulu déterminer si l'épithélium thymique était également affecté similairement pendant la grossesse. Contrairement aux thymocytes, aucun changement dans la

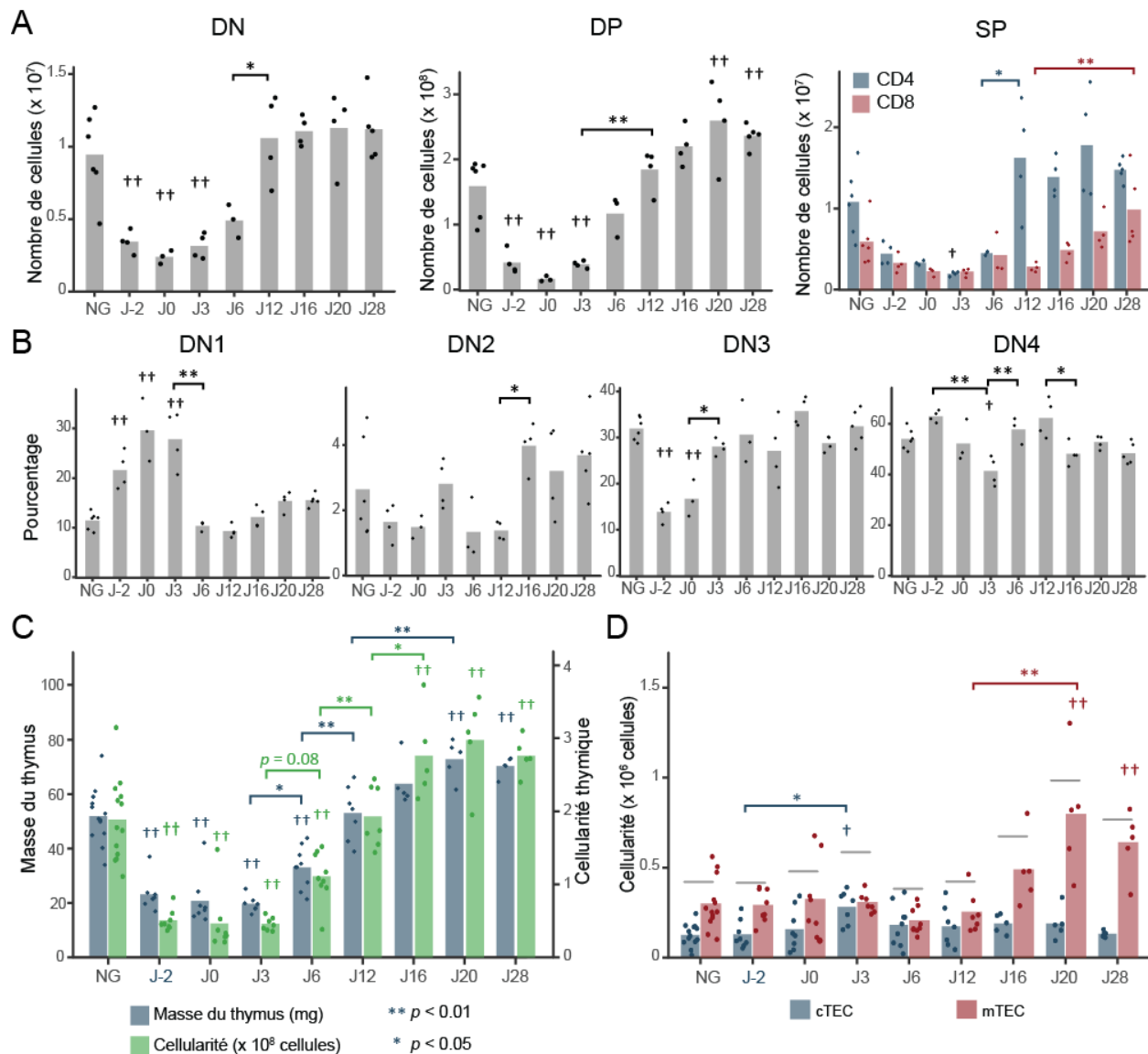


Figure 4.1 | La régénération précoce n'est pas associée à une expansion de l'épithélium thymique

(A) Les nombres de cellules des sous-populations de thymocytes ($n = 3$ à 6), (B) les pourcentages des sous-populations de DN ($n = 3$ à 6). (C) La cellularité totale et la masse du thymus ($n = 5$ à 13), et (D) les nombres de TEC ($n = 5$ à 13) ont été mesurés à différents moments pendant l'involution et la régénération. Les moyennes ont été illustrées par les barres, alors que chaque point représente un individu. Pour (D), le nombre total moyen de TEC (cTEC + mTEC) est illustré par une ligne noire. La significativité a été déterminée par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur, suivie d'un test post-hoc de Tukey. Les croix (+) symbolisent une différence significative par rapport au contrôle NG.

cellularité de l'épithélium thymique ne survient pendant la grossesse, ni pendant les premiers jours de la régénération (Figure 4.1D, p.97). On observe cependant une augmentation du nombre de cTEC à J3 (2.5x comparativement au contrôle NG), mais leur nombre revient à des niveaux normaux dès J6. Cela montre que l'involution induite par la grossesse n'implique pas de perte cellulaire dans les populations épithéliales du thymus. Comme le nombre de cTEC et de mTEC est similaire au contrôle NG pendant la phase de croissance active du thymus (J6 et J12), cela montre qu'une expansion du tissu épithélial (i.e. une augmentation du nombre de TEC) n'est pas nécessaire à la régénération du thymus en période postpartum. En phase tardive de régénération, le nombre de mTEC augmente à des niveaux 1.6 à 2.6x plus élevés que le contrôle NG. Comme le thymus est déjà en hypertrophie à ce moment, cela montre que l'expansion des mTEC ne cause pas la régénération thymique. À l'inverse, il semble plutôt que l'expansion des mTEC soit attribuable à l'augmentation du nombre de thymocytes, puisque la maturation et la prolifération des mTEC nécessitent une stimulation par les thymocytes SP nouvellement sélectionnés (*crosstalk*)^{122,339-342}. Cela suggère que l'augmentation du nombre de SP4 observée à partir de J12 provoque l'expansion des mTEC observée entre J16 et J28.

4.3.2 *Foxn1* est impliqué dans la régénération thymique postpartum

Comme l'expansion des TEC n'est pas nécessaire à la régénération postpartum, nous avons investigué les changements d'expression génique dans les TEC. Pour ce faire, nous avons séquencé le transcriptome des cTEC et des mTEC à 16 différents moments (Figure 4.2, p.99).

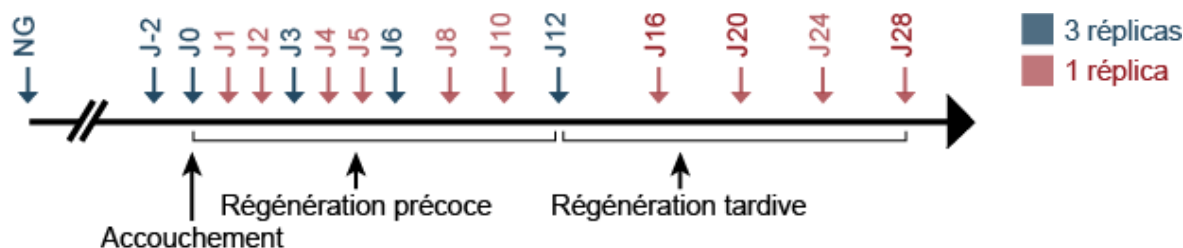


Figure 4.2 | Schéma expérimental d'analyses transcriptomiques

Le jour J0 correspond au jour de l'accouchement. Les temps d'analyse en rouge sont ceux pour lesquels un seul réplica a été séquencé, alors que les temps en bleu ont trois réplicas chacun.

Deux gènes ont précédemment été identifiés comme nécessaires à la régénération thymique dans d'autres modèles chez l'adulte : *Foxn1*²⁰⁸ et *Bmp4*²⁴⁸. *Foxn1* est un facteur de transcription exprimé par les TEC, essentiel à leur différenciation. L'expression de *Foxn1* est maximale en jeune âge, avant la puberté, et son expression diminue graduellement avec l'âge¹⁰¹. De plus, l'induction d'une surexpression de *Foxn1* dans un thymus âgé et involué (12 et 24 mois chez la souris) est suffisante pour induire une régénération du thymus, dénotée par la croissance de l'organe et un retour à des caractéristiques phénotypiques associées aux jeunes souris, tant au niveau de l'architecture tissulaire que de l'expression de gènes impliqués dans la thymopoïèse (MHC-II, *Ccl25*, *Dll4*, *Aire*, etc.)²⁰⁸. L'expression de *Foxn1* pendant la grossesse est grandement diminuée chez les cTEC, mais pas chez les mTEC (Figure 4.3A, p.100). Cependant, dès J0, l'expression de *Foxn1* augmente et reste élevée pendant toute la phase régénérative précoce (J0 à J12). On observe également une augmentation de l'expression des cibles de FOXN1 à partir de J2, et particulièrement à J6 dans les cTEC (Figures 4.3B et C, p.100). Étonnamment, l'expression de *Foxn1* et de ses cibles diminue en phase tardive de la régénération (J16 à J28, Figure 4.3A, p.100).

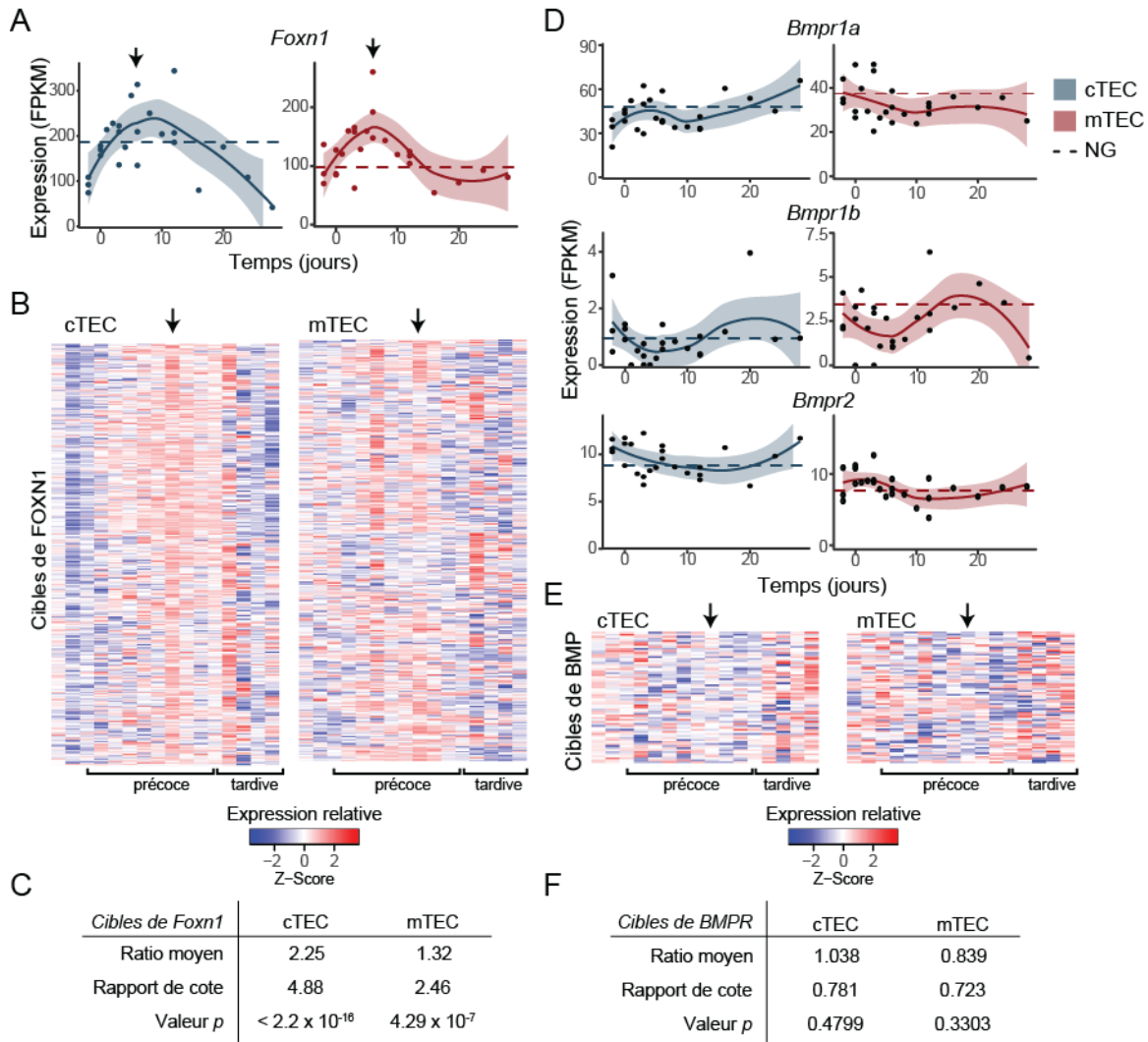


Figure 4.3 | *Foxn1* est impliqué dans la régénération postpartum précoce

(A) Expression de *Foxn1* chez les cTEC et les mTEC. (B) Expression relative (Z-score) des cibles de FOXN1 pendant la régénération thymique. (C) Augmentation moyenne de l'expression des cibles de FOXN1 entre J-2 et J6 et résultats d'un test exact de Fisher (rapport de cote, ou *odds ratio*, et valeur *p*) pour une augmentation d'expression > 2 pour les cTEC et mTEC. (D) Expression des récepteurs de BMP4 chez les cTEC et mTEC. (E) Expression relative (Z-score) des cibles de BMP dans les cTEC et mTEC. (F) Augmentation moyenne de l'expression des cibles de BMP (GO:0030510) entre J-2 et J6 et résultats d'un test exact de Fisher pour une augmentation d'expression > 2 pour les cTEC et mTEC. Pour (A) et (D), les points représentent l'expression dans chaque réplica, une régression non-linéaire et son intervalle de confiance (95%) sont représentés par les lignes colorées (bleues pour cTEC et rouges pour mTEC). L'expression moyenne dans les contrôles NG est indiquée par la ligne pointillée. Pour (B) et (E), des expressions relatives basses et hautes sont représentées respectivement par les couleurs bleues et rouges et chaque colonne

représente un temps d'analyse (soit la valeur du réplica simple ou la moyenne des trois réplicas). Le J6 est indiqué par une flèche.

Comme la diminution de l'expression de *Foxn1* avec l'âge dépend de la différenciation des thymocytes DP et SP¹⁰¹, nos résultats suggèrent que l'expansion des thymocytes pendant la régénération induit une boucle de rétroaction négative (*negative feedback loop*) inhibant *Foxn1*, probablement pour limiter la production de cellules T.

Un article récent par Wertheimer *et al* (2018) a montré que la sécrétion de BMP4 par les cellules endothéliales thymiques favorisait la régénération thymique suite à une irradiation sub-létale, entre autres en induisant une augmentation de l'expression de *Foxn1* et de ces cibles dans les TEC²⁴⁸. Nous avons voulu savoir si ces mêmes voies de signalisation étaient impliquées dans la régénération thymique postpartum. Nos résultats montrent que, bien que les récepteurs de BMP4 soient exprimés par les cTEC et les mTEC (Figure 4.3D, p.100), l'expression des cibles des BMPR (GO:0030510) n'est pas augmentée pendant la régénération thymique postpartum (Figures 4.3E et F, p.100). Nos résultats montrent que *Foxn1*, mais pas *Bmp4*, est impliqué dans la régénération thymique postpartum.

4.3.3 Les cTEC induisent la régénération thymique

Plusieurs cibles de FOXN1 jouent un rôle important dans l'induction de la migration, la différenciation, la survie et la prolifération des thymocytes pendant leur développement. Nous avons donc voulu déterminer si l'expression de ces molécules clés étaient modulée pendant l'involution induite par la grossesse et la régénération postpartum. Nous avons débuté par les gènes exprimés par les cTEC et reconnus comme essentiels à la thymopoïèse^{343–345} : les chimiokines *Ccl25* et *Cxcl12*, les cytokines *Il7* et *Kitl* et le ligand de Notch *Dll4*. L'expression de ces différentes molécules est essentielle dans l'établissement d'un microenvironnement favorable au développement des cellules T¹¹.

Elles régulent l'import des précurseurs lymphoïdes et leur migration dans le stroma thymique (*Cxcl12*, *Ccl25*), leur survie et prolifération (*Ccl25*, *Cxcl12*, *Il7*), ainsi que leur différenciation (*Dll4*, *Cxcl12*, *Il7*, *Kitl*)^{11,18,230,346,347}. À la fin de la grossesse, l'expression de *Ccl25*, *Cxcl12* et *Dll4* est diminuée significativement (Figure 4.4A, p. 103, et Table 4.1, p.105), confirmant les résultats obtenus par Laan *et al* (2016). Pendant la régénération, toutes ces molécules montrent une surexpression comparativement au J-2, mais aussi comparativement au contrôle NG (Figure 4.4A, p.103, et Table 4.1, p.105). Pendant la régénération tardive (J16 à J28), alors que le thymus est en hypertrophie, l'expression de ces gènes diminue de nouveau, jusqu'à des niveaux plus bas que le contrôle NG. Ces changements d'expression génique chez les cTEC sont associés à leur différenciation et à leur prolifération. En effet, l'expression de molécules impliquées dans la présentation antigénique des cTEC (*Psm11*, *Ctsl*, *Prss16* et *Cd83*)^{42,46,48,49,348} est diminuée pendant la grossesse et augmentée pendant la régénération précoce (Figure 4.4A, p.103, et Table 4.1, p.105). De plus, l'expression de MHC-II, molécules définissant les sous-populations de cTEC plus matures^{83,142,349}, ainsi que l'activité proliférative des cTEC sont fortement diminuées à la fin de la grossesse, puis augmentent pendant la régénération précoce (Figures 4.4B et C, p.103). La proportion de cTEC Ly51+MHC-II^{hi}, contenant la majorité des

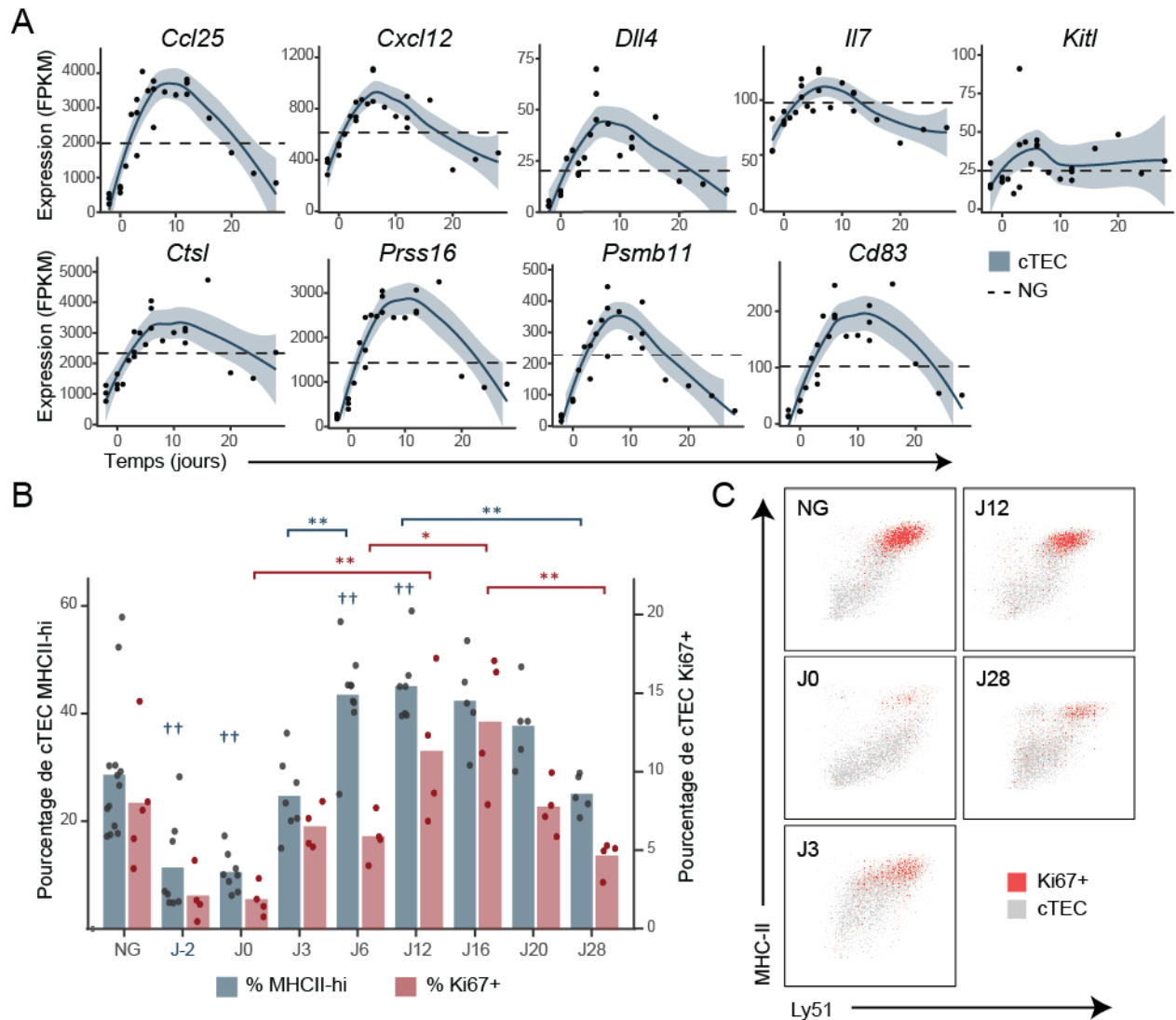


Figure 4.4 | Les changements phénotypiques des cTEC précèdent l'expansion des DN

(A) Expression de molécules impliquées dans la migration et la différenciation des thymocytes DN et dans la présentation antigénique par les cTEC. Les points représentent l'expression dans chaque réplica, une régression non-linéaire et son intervalle de confiance (95%) sont représentés par la ligne colorée. L'expression moyenne dans les contrôles NG est indiquée par la ligne pointillée. (B) Le pourcentage de cTEC MHC-II^{hi} (n = 5 à 13) et Ki67⁺ (n = 4 à 5). Les moyennes ont été illustrées par les barres, alors que chaque point représente un individu. La significativité a été déterminée par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur, suivie d'un test post-hoc de Tukey. Les croix (+) symbolisent une différence significative par rapport au contrôle NG. (C) Profils représentatifs de l'expression de Ly51 et MHC-II pour les cTEC totales (gris) et les cTEC Ki67⁺ (rouge).

cellules prolifératives (Ki67+), est fortement diminuée à la fin de la grossesse, mais augmente à nouveau pendant la régénération précoce, pour diminuer à nouveau en phase tardive de la régénération. D'ailleurs, les TEC expriment de haut niveau de MHC-II et prolifère activement pendant le développement postnatal du thymus, alors que le thymus est en pleine croissance¹⁴². Ces résultats suggèrent que la présence de la population de cTEC Ly51+MHC-II^{hi} est associée à la croissance du thymus. Les gènes subissant les changements les plus drastiques sont *Ccl25*, *Cxcl12*, *Dll4*, *Prss16*, *Psm11* et *Cd83*, tous des gènes régulés par *Foxn1*¹⁰⁰. D'ailleurs, leur patron d'expression pendant la cinétique corrèle fortement avec l'expression de *Foxn1* (Table 4.1, p.105). Globalement, les changements d'expression de *Foxn1*, *Ccl25*, *Dll4*, *Cxcl12*, *Prss16*, *Psm11* et *Cd83* précèdent l'expansion des thymocytes, suggérant fortement que les changements d'expression génique chez les cTEC induisent au moins partiellement la régénération thymique (Figures 4.1 et 4.4, p.97 et 103).

Table 4.1 | Expression des gènes impliqués dans la thymopoïèse chez les cTEC

Gènes	Régulation négative pendant la grossesse (de NG à J-2)		Régulation positive pendant la régénération précoce (entre J-2 et J3 à J12)		Corrélation avec <i>Foxn1</i>
	Ratio	p value	Ratio	p value	R (Pearson)
<i>Dll4</i>	-5.7x	0.0009	5.3 à 15.0x	p < 0.002	0.542
<i>Ccl25</i>	-4.6x	0.0456	6.6 à 9.3x	p < 0.02	0.706
<i>Cxcl12</i>	-1.8x	0.0076	2.1 à 2.9x	p < 0.008	0.462
<i>Prss16</i>	-7.0x	0.0058	8.3 à 12.9x	p < 0.009	0.731
<i>Psm11</i>	-6.5x	0.0450	9.0 à 12.8x	p < 0.02	0.912
<i>Cd83</i>	-6.1x	0.0152	5.8 à 12.2x	p < 0.02	0.738
<i>Foxn1</i>	-1.7x	0.2336	2.0 à 2.7x	p < 0.05	1

Le ratio de l'expression des gènes d'intérêt a été calculé entre J-2 et NG (régulés négativement pendant l'involution) et entre J3, J6 ou J12 et J-2 (régulés positivement pendant la régénération précoce). La significativité a été déterminée par un test T bilatéral non-pairé.

4.3.4 Les mTEC se différencient suite à l'expansion des thymocytes SP4

Nous avons ensuite voulu savoir comment les mTEC modifiaient leur expression génique pendant la régénération thymique. Nous avons ici aussi concentré nos analyses sur les gènes dont la fonction est connue dans la thymopoïèse chez les mTEC. Les mTEC expriment des niveaux élevés des chimiokines *Ccl19* et *Ccl21a* pendant la régénération précoce (Figure 4.5A, p.106), impliquées dans la migration des thymocytes vers la médulla suivant la sélection positive³⁵⁰. Cependant, les gènes associés à la différenciation des mTEC (*Aire*, *Cd40*, *Cd80* et *Cd86*) sont tous faiblement exprimés pendant cette période (Figure 4.5A, p.106). Au contraire, c'est pendant la régénération tardive que leur expression augmente. L'expression de ces marqueurs de

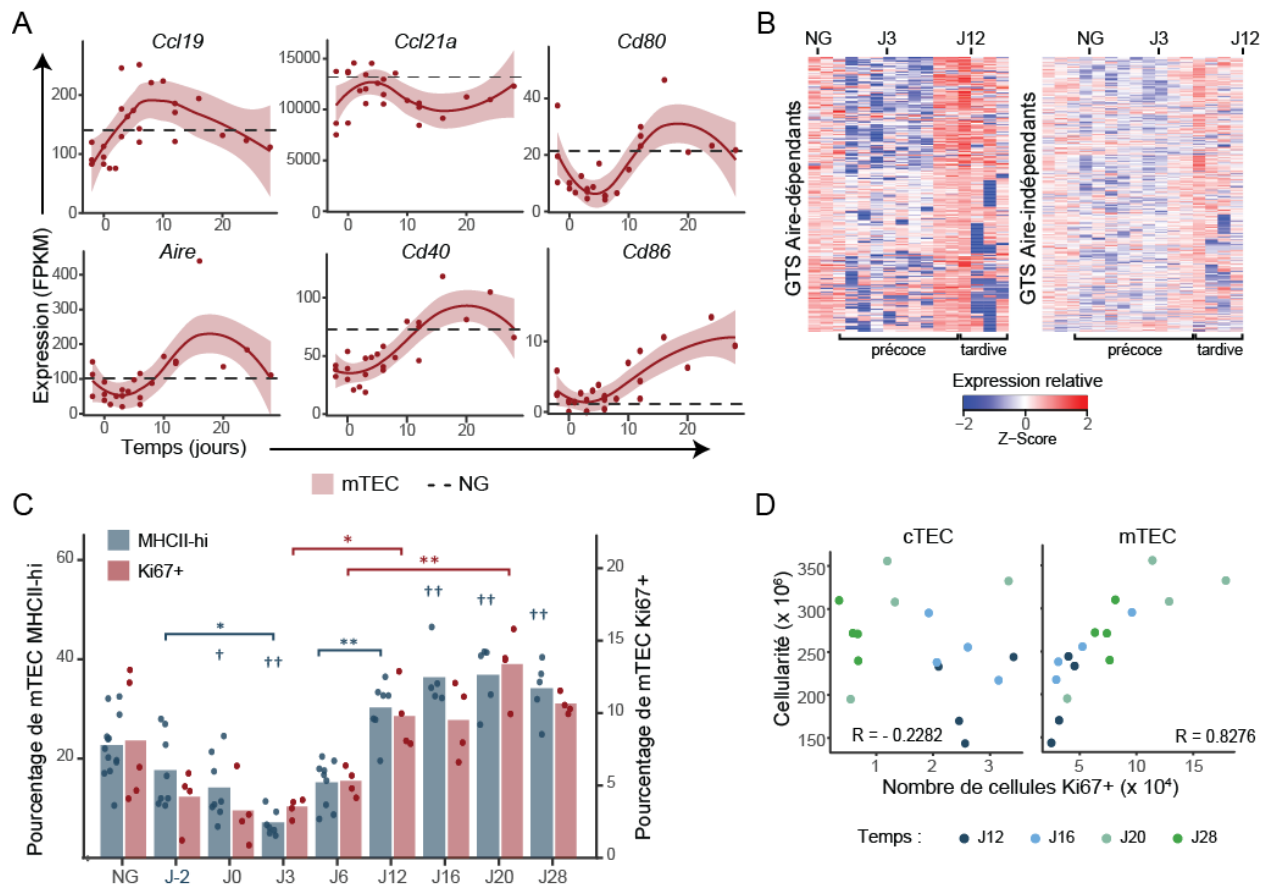


Figure 4.5 | Le maintien des mTEC matures nécessite la présence des thymocytes SP4

(A) Expression de gènes importants dans la thymopoïèse et la maturation des mTEC. Les points représentent l'expression dans chaque réplica, une régression non-linéaire et son intervalle de confiance (95%) sont représentés par la ligne colorée. L'expression moyenne dans les contrôles NG est indiquée par la ligne pointillée. (B) Expression relative (Z-score) des gènes tissus-spécifiques (GTS) Aire-dépendants et Aire-indépendants⁶² pendant la régénération thymique. Les expressions relatives basses et hautes sont représentées respectivement par les couleurs bleues et rouges et chaque colonne représente un temps d'analyse (soit le réplica simple ou la moyenne des trois réplicas). (C) Le pourcentage de mTEC MHC-II^{hi} (n = 5 à 13) et Ki67+ (n = 4 à 5). Les moyennes sont illustrées par les barres, alors que chaque point représente un individu. La significativité a été déterminée par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur, suivie d'un test post-hoc de Tukey. Les croix (†) symbolisent une différence significative par rapport au contrôle NG. (D) Corrélation Pearson entre la cellularité totale du thymus et le nombre de cellules Ki67+ pendant la régénération tardive (J12 à J28).

différenciation des mTEC corrélient avec l'expression des gènes tissus-spécifiques Aire-dépendants et Aire-indépendants⁶², l'expression de MHC-II et la prolifération des mTEC (Figures 4.5B et C, p.106). Ces résultats montrent que les mTEC se différencient pendant la régénération tardive. Enfin, le nombre de mTEC Ki67+ corrèle avec la cellularité globale du thymus (Figure 4.5D, p.106), ce qui n'est pas le cas pour les cTEC. Les variations des proportions et du nombre de mTEC^{hi} pendant la régénération postpartum coïncident avec les variations des nombres de thymocytes SP4 et SP8 (Figures 4.1A et 4.5C, p.97 et 106). La présence des thymocytes SP étant nécessaire au développement et à la différenciation des mTEC³⁴⁰, ces résultats suggèrent qu'ils sont aussi nécessaires pour leur maintien. De plus, ces résultats suggèrent fortement que les mTEC n'induisent pas le déclenchement de la régénération, mais semblent plutôt y réagir en augmentant leur différenciation et leur prolifération.

4.3.5 *Klf4* comme potentiel régulateur de la croissance thymique

Nous avons ensuite voulu déterminer quels signaux étaient à l'origine du déclenchement de la régénération thymique postpartum. Comme l'expression de *Foxn1* et de ses cibles est fortement augmentée lors de la régénération précoce, nous avons voulu savoir si l'expression de *Foxn1* était régulée par les récepteurs des estrogènes et de la progestérone. Pour ce faire, nous avons analysé la région promotrice de *Foxn1* pour prédire les sites de liaison de facteurs de transcription en utilisant l'outil MatInspector, par Genomatix³⁵¹. Comme l'involution associée à la grossesse est induite par les hormones sexuelles¹⁴⁹, nous avons voulu savoir si *Foxn1* pourrait être régulé directement par les récepteurs d'hormones sexuelles, tels que *Esr1*, *Esr2* et *Pgr*. Les récepteurs de progestérone et d'estrogènes pouvant agir à de très grandes distances (>10 kb)^{352,353}, nous avons analysé une large région entourant *Foxn1*, soit -25kb en amont et +10kb en aval du site d'initiation de transcription (*transcription start site*, TSS). Nous avons trouvé que la

région promotrice de *Foxn1* contenait plusieurs sites de liaison des familles de matrices des éléments répondant aux estrogènes (*estrogen responsive elements*, V\$EREF), contenant les récepteurs des estrogènes (*Esr1*, *Esr2*), et la famille de matrices répondant aux glucocorticoïdes et éléments associés (*glucocorticoid responsive and related elements*, V\$GREF), contenant les récepteurs de la progestérone (*Pgr*), des androgènes (*Ar*), des glucocorticoïdes (*Nr3c1*) et minéralocorticoïdes (*Nr3c2*) (voir Table 4.2, p.108). Ces résultats suggèrent que les récepteurs des estrogènes et de la progestérone, mais aussi des androgènes et glucocorticoïdes pourraient directement réguler l'expression de *Foxn1*.

Table 4.2 | Sommaire des sites de liaison des familles V\$EREF et V\$GREF dans le promoteur de *Foxn1*

Famille	Récepteur	Matrice	Information sur la matrice	# sites	# total
V\$EREF	<i>Esr1</i>	V\$ER.01	Estrogen receptor, IR3 sites	3	33
		V\$ER.02	Estrogen response elements (ER alpha), IR3 sites	1	
		V\$ER.03	Estrogen response elements (ER alpha), IR3 sites	8	
		V\$ER.04	Estrogen response elements (ER alpha), IR3 sites	11	
	<i>Esr2</i>	V\$ESR2.01	Estrogen receptor 2 (ER beta)	10	10
V\$GREF	<i>Ar</i>	V\$ARE.02	Androgen receptor binding site, IR3 sites	19	35
		V\$ARE.03	Androgen receptor binding site, IR3 sites	9	
		V\$ARE.04	Androgen receptor binding site, IR3 sites	7	
	<i>Pgr</i>	V\$PRE.01	Progesterone receptor binding site, IR3 sites	14	14
	<i>Nr3c1</i>	V\$GRE.01	Glucocorticoid receptor, C2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs, IR3 sites	8	47
		V\$GRE.02	Glucocorticoid receptor, IR3 sites	27	
		V\$GRE.03	Glucocorticoid receptor, IR3 sites	12	
	<i>Nr3c2</i>	V\$MRE.01	Mineralocorticoid receptor response element	2	2

En second lieu, nous avons voulu déterminer si d'autres facteurs de transcription pourraient être impliqués dans la régulation de *Foxn1*. La famille de matrice montrant le plus grand nombre de sites de liaison dans le promoteur de *Foxn1* est la famille des facteurs de transcription *Krueppel-like factors*, ou KLF (V\$KLFS) (voir Table Supplémentaire S3.1, Annexe III, p.xiii), composée de 17 membres chez la souris. Ces

facteurs de transcription agissent comme effecteurs de la signalisation des récepteurs nucléaires, dont font partie les récepteurs d'hormones sexuelles. Les KLFs agissent selon différents mécanismes : (1) leur expression peut être directement régulée par les récepteurs nucléaires, pour agir comme médiateurs secondaires de la réponse hormonale; (2) ils peuvent agir à titre de facteurs de transcription accessoires, activant ou inhibant l'activité des récepteurs nucléaires sur les gènes régulés par ces derniers et (3) ils peuvent directement réguler l'expression des récepteurs nucléaires, modifiant ainsi la sensibilité cellulaire aux hormones³⁵⁴. Des 17 membres de la famille KLF, quatre montraient une expression forte dans les TEC: *Klf2*, *Klf4*, *Klf6* et *Klf9* (Figure 4.6A, p.110). En comparaison, les récepteurs de la progestérone (*Pgr*) et des estrogènes (*Esr1*) ne sont que faiblement exprimés par les TEC (Figure 4.6A, p.110), le récepteur *Esr2* n'étant exprimé qu'à des niveaux très faibles (expression moyenne < 0.2 FPKM). Plusieurs sites de liaison sont retrouvés dans la région promotrice de *Foxn1* pour chacun des *Klf* exprimés (Table 4.3, p.111). Chez les cTEC, alors que les quatre *Klf* sont inhibés pendant la régénération thymique précoce, *Klf4* montre la plus forte corrélation négative avec *Foxn1* (Figure 4.6B, p.110). De plus, plusieurs sites de liaison pour *Klf4* se retrouvent à proximité des sites de liaison pour *Esr1* et *Prg* (Figure 4.6C, p.110). Ces résultats suggèrent que *Klf4* est un inhibiteur transcriptionnel de *Foxn1*, possiblement comme facteur de transcription accessoire à *Esr1* et *Pgr*.

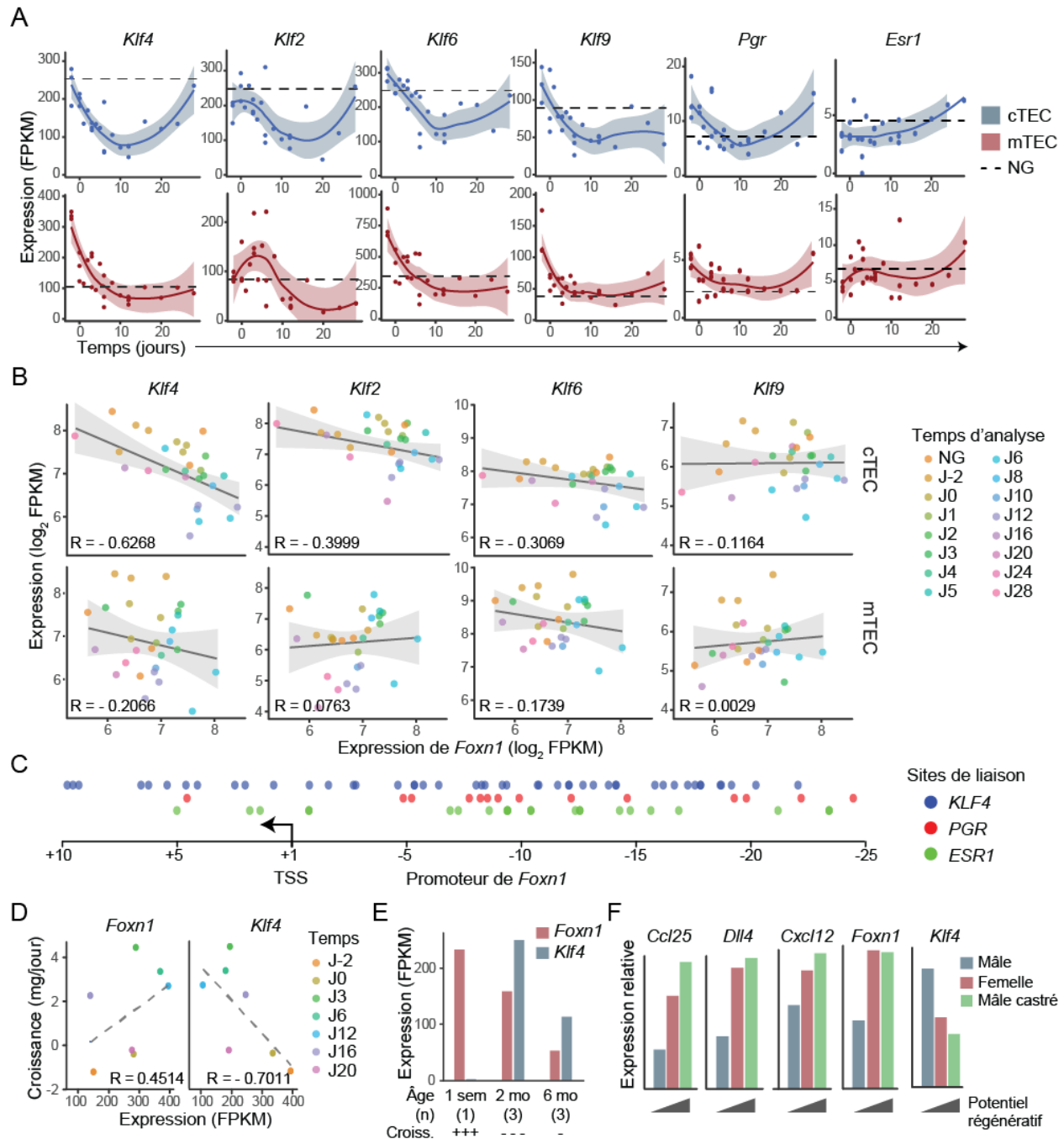


Figure 4.6 | Klf4 est inhibé pendant la régénération précoce

(A) Expression de *Klf4/2/6/9*, *Pgr* et *Esr1* pendant la régénération postpartum. Les points représentent chaque réplica, une régression non-linéaire et son intervalle de confiance (95%) sont représentés par la ligne colorée (bleu : cTEC, rouge : mTEC). L'expression moyenne dans les contrôles NG est indiquée par la ligne pointillée. (B) Corrélation Pearson entre l'expression des *Klf* et *Foxn1*. (C) Prédiction des sites de liaison pour *Klf4*, *Esr1* et *Prg* dans le promoteur de *Foxn1*. (D) Corrélation Pearson entre l'expression de *Foxn1* ou *Klf4* et la croissance du thymus (mg/jour).

(E) Expression de *Foxn1* et de *Klf4* dans les cTEC à différents âges chez la souris. (F) Expression de gènes impliqués dans la thymopoïèse et la régénération thymique, ainsi que *Klf4* dans les mâles, femelles et mâles castrés à 6 mois d'âge. Les données à 1 semaine et à 6 mois ont été extraites des articles de St-Pierre *et al* (2013) et Dumont-Lagacé *et al* (2015)^{282,302}.

Table 4.3 | Sites de liaison des *Klf2/4/6/9* dans le promoteur de *Foxn1*

Gène	Matrice	Information sur la matrice	# sites	# total
KLF2	V\$KLF2.01	Krueppel-like factor 2 (lung) (LKLF)	42	42
KLF4	V\$GKLF.01	Gut-enriched Krueppel-like factor/KLF4	21	47
	V\$GKLF.02	Gut-enriched Krueppel-like factor	18	
	V\$GKLF.03	Gut-enriched Krueppel-like factor	8	
KLF6	V\$KLF6.01	Core promoter-binding protein (CPBP) with 3 Krueppel-type zinc fingers (KLF6, ZF9)	21	21
KLF9	V\$BTEB3.01	Basic transcription element (BTE) binding protein, BTEB3, FKLF-2	14	14

Nous avons ensuite voulu déterminer l'impact de *Klf4* sur la croissance du thymus dans le contexte de la régénération postpartum. Nous avons donc calculé un taux de croissance (ΔC) en divisant la différence de masse (Δm) entre 2 temps d'analyse par le nombre de jour (Δt) entre ces deux temps d'analyse :

$$\Delta C = \Delta m / \Delta t$$

Les taux de croissance sont ensuite associés à l'expression de *Foxn1* ou *Klf4* au temps précédent (par exemple, le taux de croissance entre J0 et J3 est associé à l'expression du gène mesuré à J0). De façon surprenante, l'expression de *Klf4* montre une corrélation plus forte avec les taux de croissance du thymus que l'expression de *Foxn1* (Figure 4.6D, p.110). Ainsi, une faible expression de *Klf4* est associée à une croissance du thymus dans les jours suivants, et inversement. Nous avons ensuite voulu déterminer si l'expression de *Klf4* par les cTEC pourraient jouer un rôle dans l'involution thymique reliée à l'âge. Le thymus est en croissance rapide seulement en très jeune âge, de la naissance jusqu'à l'âge de 4-6 semaines chez la souris. Par la suite, le thymus subit une involution rapide (entre 6 et 12 semaines, coïncidant avec la puberté), qui se stabilise par la suite (> 3 mois)^{142,302}.

Nos résultats montrent que l'expression de *Klf4* par les cTEC corrèle davantage avec les taux de croissance du thymus que l'expression de *Foxn1* (Figure 4.6E, p.110). En effet, alors que l'expression de *Foxn1* diminue graduellement avec l'âge, sans modulation liée au taux d'involution thymique, l'expression de *Klf4* reflète directement les taux de croissance ou d'involution du thymus.

Finalement, nous avons déterminé dans une étude précédente que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la thymopoïèse était significativement diminuée chez les mâles comparativement aux femelles et aux mâles castrés en jeune âge³⁰². De plus, le potentiel régénératif du thymus suite à une déplétion des cTEC dépend des hormones sexuelles²⁶⁴ selon la relation suivante : mâles castrés > femelles > mâles, les femelles et les mâles castrés montrant des niveaux de régénération similaires. L'expression de *Ccl25*, *Dll4*, *Cxcl12* et *Foxn1* corrèle positivement, alors que *Klf4* corrèle négativement avec le potentiel régénératif du thymus dans les mâles, femelles et mâles castrés (Figure 4.6F, p.110). Collectivement, ces résultats suggèrent que *Klf4* contrôle la croissance et la régénération du thymus, en partie par la régulation de l'expression de *Foxn1*.

4.4 Discussion

Nous avons montré que l'involution thymique induite lors de la grossesse et la régénération postpartum sont associées principalement à des changements qualitatifs dans les TEC, plutôt qu'à des changements quantitatifs. Nos résultats sont en contradiction avec les résultats de Laan *et al* (2016), qui montraient une diminution importante de toutes les populations stromales (CD45-) du thymus lors du 3^e trimestre de la grossesse (aux jours 17 à 19 de gestation)³³⁴. Ceci est probablement causé par l'utilisation de protocoles différents de digestion du stroma thymique. En effet, nous avons utilisé une méthode optimisée pour maximiser l'extraction des TEC, utilisant la papaïne, la collagénase IV et la DNase I¹⁸³. D'ailleurs, le nombre de TEC extrait par cette méthode (environ 4×10^5 TEC) dans le contrôle NG est approximativement cinq fois plus élevé que celui de Laan *et al* (2016), à environ 7.5×10^4 TEC, extraites avec une solution de collagénase II, dispase I et DNase I. Toutefois, les deux études montrent une diminution de l'expression de *Ccl25*, *Cxcl12*, *Dll4* dans les cTEC pendant la grossesse. Ces mêmes gènes se retrouvent surexprimés pendant la régénération précoce, démontrant leur importance dans la régulation de la thymopoïèse. En contrepartie, les mTEC montrent peu de changements phénotypiques pendant la grossesse : l'expression de *Foxn1*, *Cd80*, *Cd86*, *Aire*, MHC-II et des gènes tissus-spécifiques reste inchangée à J-2 comparativement au contrôle NG. Ces résultats suggèrent fortement que les cTEC sont responsables de la régulation de la production de cellules T par le thymus pendant la grossesse et la régénération postpartum.

La population de cTEC MHC-II^{hi} diminue drastiquement pendant la grossesse, et réapparaît en phase régénérative précoce, suggérant que cette sous-population joue un rôle important dans la régulation de la thymopoïèse. D'ailleurs, les cTEC sont majoritairement MHC-II^{hi} dans le thymus embryonnaire (E18) et postnatal (3 jours), alors que le thymus est en pleine croissance¹⁴². De plus, pendant la croissance thymique se

produisant suite à la castration, les cTEC MHC-II^{hi} augmentent de façon transitoire 7 jours post-chirurgie¹⁴². O'Neill et al (2016) ont aussi montré que l'expression la plus élevée de *Foxn1* était retrouvée dans les cTEC MHC-II^{hi} ²⁰⁷. Nos résultats suggèrent que l'augmentation d'expression de *Foxn1* observée dès le J0 postpartum induit la différenciation des cTEC MHC-II^{hi}, qui réapparaissent à J3. De façon intéressante, cette population de cTEC MHC-II^{hi} ainsi que l'expression de *Foxn1* et de ses cibles, diminuent en phase tardive de la régénération. Comme la diminution de l'expression de *Foxn1* avec l'âge dépend de la présence des thymocytes développés au-delà du stade DN3¹⁰¹, cela suggère que la diminution d'expression de *Foxn1* en phase tardive pourrait être due aux interactions accrues avec les thymocytes DP ou SP4, qui sont en grand nombre pendant cette période.

Notre étude souligne encore une fois l'importance de *Foxn1* et de ces cibles dans la régulation de la thymopoïèse, qui a été montrée comme centrale à tous les modèles de croissance et d'involution thymique étudiés jusqu'à ce jour^{99,205,207,208,248,355}. Cependant, le mécanisme déclencheur de la régénération thymique chez l'adulte semble être différent selon le facteur provoquant l'involution. Suite à une irradiation sub-létale, la sécrétion de BMP4 par les cellules endothéliales favorise la régénération thymique²⁴⁸. Cependant, aucune activation de la signalisation par les BMPR n'est détectée dans les TEC pendant la régénération postpartum, suggérant que ce mécanisme n'est pas impliqué. Contrairement à l'involution induite par irradiation, aucun dommage au stroma thymique n'est détecté, ce qui pourrait expliquer l'absence de stimulation par les BMPR. Ces résultats montrent que différentes voies de signalisation parallèles peuvent mener à l'induction de la régénération thymique par la surexpression de *Foxn1*.

Notre étude de la cinétique d'expression génique pendant la régénération thymique nous a permis d'identifier *Klf4* comme potentiel inhibiteur de la croissance thymique. La fonction de *Klf4* dépend fortement du contexte cellulaire : son expression a

été associée à l'inhibition de la prolifération, à la prévention de l'apoptose suite aux dommages à l'ADN, à l'induction des cellules souches pluripotentes (iPSC) mais aussi à la différenciation cellulaire dans plusieurs tissus épithéliaux (revue par Ghaleb and Yang, 2017)³⁵⁶. *Klf4* agit également dans la signalisation de différentes hormones par des récepteurs nucléaires, (revue par Knoedler and Denver, 2014)^{354,357}, dont plusieurs inhibent la thymopoïèse : (1) les glucocorticoïdes, (2) les estrogènes, (3) la progestérone et (4) les androgènes (revue par Dooley and Liston, 2012)¹³². Jusqu'à ce jour, le rôle de *Klf4* dans les TEC est encore complètement inconnu, mais nos résultats suggèrent que son expression par les cTEC pourrait être nécessaire à l'induction d'une involution thymique par ces différentes hormones. De plus, son inhibition semble reliée à l'augmentation des niveaux de thymopoïèse. En effet, l'expression de *Klf4* dans les cTEC est minimale alors que le thymus est en plein croissance en période postnatale et en phase précoce de la régénération postpartum. Étudier l'impact d'une délétion de *Klf4* spécifiquement dans les TEC, particulièrement dans le contexte de l'involution reliée à l'âge ou aux hormones sexuelles, nous permettra de déterminer si *Klf4* est un nouveau régulateur de la fonction thymique. Enfin, il sera intéressant de déterminer si l'expression de *Foxn1* est directement régulée par *Klf4* à partir d'un séquençage de l'ADN lié par KLF4 dans les TEC (par immunoprécipitation de la chromatine ou ChIP-Seq).

4.6 Matériels et méthodes

4.6.1 Souris

Les souris femelles B.6SJL-Ptprc^a Pep3^b/BoyJ-CD45.1 (#002014, aussi appelées B6.SJL) provenant de The Jackson Laboratory (Bar Harbor) ont été mises en reproduction et hébergées sous des conditions exemptes de pathogènes spécifiques dans des cages ventilées et stériles à l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC) de l'Université de Montréal. Les femelles ont été mise en reproduction allogénique avec des mâles BALB/cJ (#000651). Comme l'allaitement retarde la régénération thymique, les souriceaux ont été retirés dès la naissance. Tous les protocoles suivent les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux et ont été approuvés par le Comité de Déontologie et Expérimentation Animale de l'Université de Montréal.

4.6.2 Digestion du stroma thymique

L'enrichissement des cellules stromales du thymus a été effectué tel que décrit par Kim *et al* (2015)¹⁸³. Brièvement, le thymus a été découpé en petits morceaux dans du RPMI avec HEPES à température pièce, puis agité par pipettage avec des tips à grande ouverture afin de libérer doucement les thymocytes du stroma. Une fois les thymocytes retirés, le stroma est placé à 37°C avec une solution de papaine 0.5 mg/ml (Worthington Biochemical Corporation), DNase 0.1 mg/ml (Sigma) et Collagénase D 0.25 mg/ml (Sigma) pour 3 incubations successives de 15 minutes chacune. Entre chaque digestion, les fragments de stroma thymique sont agités en utilisant une pipette P1000 avec embouts à grande ouverture, puis embouts normaux. Après la 2e digestion, le surnageant est retiré et les cellules sont diluées dans du PBS 1X avec 0.5% BSA (*bovine serum albumin*, Sigma), gardé à température pièce pour éviter un choc de température trop grand. Après la

troisième incubation, les cellules sont rassemblées puis centrifugées, graduellement amenées à 4°C pendant la centrifugation et filtrées avant d’être marquées pour l’analyse.

4.6.3 Cytométrie en flux

La viabilité des cellules a été vérifiée par marquage au propidium iodine (BD Biosciences). Les cellules ont été triées sur un FACS Aria à trois lasers (BD Biosciences) ou analysés sur un BD FACS Canto II et LSR II (BD Biosciences). La liste des anticorps utilisés est en annexe III, Table S3.2, p. xiv.

4.6.4 Séquençage de l’ARNm

Nous avons analysé le transcriptome par séquençage d’ARNm de deux populations de TEC (EpCAM+CD45-) : cTEC (UEA1-) et mTEC (UEA1+). Ces cellules ont été isolées du thymus de femelles non-gestantes (contrôle NG), de femelles enceintes au jour 18 de grossesse (J-2) et de femelles après l’accouchement (de J0 à J28). Chaque réplica est isolé d’une seule souris, pour un minimum de 13 000 cellules par échantillons. L’ARN est extrait dans du Trizol™ (Invitrogen), tel que recommandé par le fournisseur, et ensuite purifié avec le kit RNeasy Micro columns (Qiagen). La qualité des échantillons a été confirmée par Bioanalyzer RNA Pico (Agilent) et les bibliothèques des transcriptomes ont été construites avec le KAPA RNA HyperPrep PolyA (Roche), puis validées par Bioanalyzer (Agilent). Le séquençage a ensuite été effectué sur le Nextseq500 (NextSeq High Output 75 cycles) à la plateforme de Génomique de l’Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC) de l’Université de Montréal.

Les séquences adaptatrices et les régions 3’ de basse qualité ont été retirées avec Trimmomatic (version 0.35)³⁵⁸ et alignées au génome de référence de la souris GRCm38)

avec STAR version 2.5.1b³⁵⁹. L'expression génique a été déterminée en FPKM (*Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*) par l'outil RSEM³⁶⁰.

Les analyses ont été effectuées avec le logiciel R (<http://www.r-project.org/>). Nous avons retiré les gènes exprimés à de faibles niveaux de l'analyse (moyenne d'expression < 0.5 FPKM). Les données d'expression à 1 semaine d'âge et à 6 mois d'âge chez les femelles, mâles et mâles castrés ont été extraites de St-Pierre *et al* (2013, GSE44945) et de Dumont-Lagacé *et al* (2015, GSE66873)^{282,302}.

4.6.5 Prédiction des sites de liaison de facteurs de transcription

Les sites de liaison des facteurs de transcription dans la région -25kb à +10kb du TSS de *Foxn1* (Chr11 : 78,376,608-78,411,608) ont été prédits par l'outil MatInspector, de Genomatix³⁵¹ (similarité de matrice > 0.85). Un sommaire des familles de matrice les plus fréquentes est trouvée en Table supplémentaire S3.1, en Annexe III, p. xiii.

4.7 Contributions

La conception expérimentale et les analyses bio-informatiques ont été réalisées conjointement par Maude Dumont-Lagacé (MDL) et Tariq Daouda (TD). La collecte des données a été effectuée par MDL. Le chapitre a été rédigé par MDL et révisé par TD et Claude Perreault (CP). CP a fourni les ressources matérielles et financières pour la réalisation de ce projet.

Chapitre 5 - Discussion

Dans ce travail, nous avons acquis une meilleure compréhension des mécanismes régulant la fonction thymique. Dans le chapitre 2, nous avons montré que les hormones sexuelles influencent profondément les TEC, et ce, de façon spécifique aux types cellulaires, modulant leur fonctionnalité, leur survie et leur prolifération. Dans le chapitre 3, nous avons montré l'existence d'une sous-population de cTEC quiescentes qui prolifèrent activement pendant la régénération thymique précoce suivant une insulte tissulaire induite par les radiations. Dans le chapitre 4, nous avons étudié les changements phénotypiques et transcriptomiques dans les TEC qui se produisent pendant la régénération thymique postpartum afin d'en comprendre les mécanismes régulateurs et d'identifier de potentiels gènes clés dans le déclenchement de ce phénomène. De ces trois études ressortent quatre motifs importants :

(1) Il ne semble pas y avoir de lien direct entre le nombre total de TEC et le taux de thymopoïèse. En effet, nous n'avons observé aucun changement dans les nombres de cTEC et de mTEC pendant la gestation et la phase précoce de régénération thymique postpartum. Le terme « régénération thymique » est donc ambigu, puisqu'on l'utilise principalement pour référer à l'augmentation de la cellularité globale du thymus, constitué principalement de thymocytes (>99%). Dans le cas de la régénération postpartum, dans laquelle aucun changement de cellularité de l'épithélium thymique ne se produit, il serait plus précis de parler de régénération de la thymopoïèse. À l'opposé, lors d'une involution impliquant des dommages à l'épithélium thymique comme lors d'une irradiation, il serait plus adéquat de parler de régénération thymique, incluant à la fois les phénomènes de régénération des thymocytes et de l'épithélium thymique.

Il semble cependant y avoir un lien entre le nombre de mTEC et les taux de thymopoïèse, puisque le nombre de mTEC augmente drastiquement en phase tardive de

la régénération postpartum alors que le thymus est en hypertrophie (Figures 4.1C et D, p.97). Pendant cette période, le nombre de mTEC corrèle fortement avec la cellularité globale du thymus (Figure 4.5D, p.106). Cela est probablement un reflet de l'importance du *crosstalk* pour la survie et la maturation des mTEC^{8,119}. De plus, en conditions d'homéostasie, il existe une corrélation modérée entre les taux de prolifération des TEC et la cellularité globale du thymus, ainsi qu'une très forte corrélation entre la prolifération des cTEC et des mTEC (Figure 2.1E, p.42). Ces résultats suggèrent que la prolifération des deux sous-types de TEC est régulée par des mécanismes similaires reliés au taux de thymopoïèse.

(2) Les cTEC semblent jouer un rôle crucial dans la régulation de la fonction thymique, par leur régulation du taux d'import de précurseurs lymphoïdes dans le thymus et de différenciation et prolifération des thymocytes en début de développement. Pendant la régénération postpartum, ce sont d'abord les cTEC qui subissent des changements phénotypiques et transcriptomiques (J0 à J12). De façon intéressante, ces changements chez les cTEC précèdent l'augmentation du nombre de thymocytes DN2 et DN3, suggérant que ces changements d'expression génique chez les cTEC permettent le déclenchement de la régénération postpartum. Cette hypothèse est appuyée par la corrélation claire entre l'expression de *Foxn1* et les taux de thymopoïèse (mesuré par la cellularité globale du thymus)⁹⁹ et l'importance des molécules de stimulation *Ccl25*, *Dll4*, *Cxcl12* et *Kitl* dans l'établissement d'un microenvironnement supportant la thymopoïèse¹¹. De plus, seuls les cTEC augmentent leur prolifération en phase précoce de la régénération thymique, et ce, dans les deux modèles que nous avons étudiés (en période postpartum ou suite à l'involution aiguë provoquée par irradiation).

À l'opposé, les mTEC semblent plutôt réagir au taux de thymopoïèse dicté par les cTEC, en régulant leur fonction et leur prolifération. Pendant la régénération précoce,

alors que les cTEC augmentent rapidement l'expression de gènes clés de la thymopoïèse, les mTEC expriment faiblement les gènes impliqués dans la sélection négative (*Cd80*, *Cd86*, *Aire*, MHC-II, et expression ectopique de gènes tissus-spécifiques). Cette hypothèse est également appuyée par le fait que les mTEC se développent plus tard que les cTEC dans le développement embryonnaire et post-natal du thymus¹⁴² et que le développement de la médulla nécessite la présence de thymocytes SP (i.e. ayant été sélectionnés positivement par les cTEC)^{8,119}. Cet effet semble être reflété par la co-occurrence en phase tardive de la régénération postpartum de l'augmentation du nombre de thymocytes SP4 et des changements phénotypiques des mTEC (augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la sélection négative, de l'expression ectopiques de gènes tissus-spécifiques et de la prolifération des mTEC).

Cette hypothèse plaçant les cTEC comme modulateurs de la fonction thymique est également supportée par deux autres observations. Premièrement, les cTEC sont davantage affectées par les hormones sexuelles que les mTEC. En effet, les cTEC montrent un plus grand nombre de gènes différentiellement exprimés avec un ratio d'expression (fold-change) > 3 (Figure 2.2C, p.45). Ainsi, il est possible que ce soit principalement par leur modulation des cTEC que les hormones sexuelles influencent les taux de thymopoïèse. Deuxièmement, les cTEC sont plus résistantes aux radiations que les mTEC et seuls les cTEC montrent une augmentation de l'expression de *Foxn1* aux jours 4 et 7 suivant une involution aiguë induite par irradiation sub-létale²⁴⁸. Ces résultats suggèrent que cette résistance accrue chez les cTEC pourrait être cruciale à la régénération du thymus et que celles-ci constituent la cible cellulaire thérapeutique à considérer pour moduler l'activité et la régénération du thymus.

(3) Nous avons maintenant une meilleure compréhension de l'impact hautement spécifiques des hormones sexuelles sur les cTEC et les mTEC. Une des observations les

plus intéressantes relevées par notre étude est le recoupement minimal des gènes différentiellement exprimés entre les cTEC et les mTEC. En effet, les cTEC et mTEC ne partagent qu'entre 8 et 16% des gènes différentiellement exprimés entre deux conditions. Ces résultats soulignent à quel point l'effet des hormones sexuelles diffère selon le type cellulaire. Notre travail atteste également de l'importance de considérer le sexe des sujets analysés dans les études portant sur le système immunitaire en général.

(4) La grande résolution temporelle de notre étude de la cinétique de régénération thymique postpartum nous a permis de mieux comprendre la séquence de changements phénotypiques et transcriptomiques accompagnant le processus régénératif. Au cœur de ce processus régénératif se trouve le facteur de transcription *Foxn1*, plus fortement exprimé chez les cTEC, qui régule l'expression de gènes clés impliqués dans l'importation, la prolifération et la différenciation des progéniteurs lymphoïdes dans le thymus (*Dll4*, *Ccl25*, *Cxcl12*, *Psm11*, *Prss16*, etc.)¹⁰⁰. La présence de sites de liaison pour les récepteurs d'hormones sexuelles dans la région promotrice de *Foxn1* suggère que ce dernier pourrait être régulé directement par *Esr1* et *Pgr*, mais aussi par le récepteur des androgènes (*Ar*). Nous avons précédemment démontré que les cTEC sont particulièrement influencées par les hormones sexuelles, qui sont connues pour réguler les taux de production de cellules T du thymus. En particulier, la présence d'androgènes est associée à l'inhibition de l'expression de gènes de la thymopoïèse (e.g. *Foxn1*, *Kitl*, *Bmp4*) ainsi qu'à une prolifération plus lente des cTEC. Bien que nous n'ayons pas détecté de différences entre la cellularité totale du thymus avec les mâles, femelles et mâles castrés en jeune âge, d'autres ont rapporté que l'involution thymique liée à l'âge était accélérée chez les mâles¹⁴⁸. Enfin, il est possible que le dimorphisme sexuel observé dans les TEC affectent le développement des cellules T, participant peut-être au dimorphisme sexuel observé en périphérie (réponses immunitaires plus fortes chez les femelles, etc.)²⁵³.

Un autre aspect intéressant mis en lumière par notre analyse est l'effet de boucle de régulation négative qui semble se produire en régénération tardive. En effet, l'expression de *Foxn1* et de ses cibles (en particulier *Cxcl12*, *Ccl25*, *Dll4*, *Prss16*, *Psm11* et *Cd83*) redescend pendant la régénération tardive à des niveaux inférieurs au contrôle non gestant et similaires à J-2 (Figures 4.3A, 4.3B et 4.4A, p.100 et 103). Cette inhibition survient au moment où le thymus est en hypertrophie et lorsque les SP4 sont en grand nombre, suggérant qu'une forte thymopoïèse ou la présence des SP4, inhibe l'activité des cTEC.

La résolution temporelle de notre étude transcriptomique nous a permis d'identifier *Klf4* comme potentiel régulateur de la thymopoïèse. *Klf4* fait partie de la famille des facteurs de transcription *Krueppel-like factors*, qui agissent à titre d'effecteurs des récepteurs nucléaires, dont font partie les récepteurs d'hormones sexuelles³⁵⁴. Les KLFs sont des facteurs de transcription à doigt de zinc (*zinc-finger transcription factors*) qui régulent plusieurs fonctions biologiques liées à la prolifération et la différenciation cellulaire, et ce, dans de nombreux tissus³⁵⁴. Ils peuvent activer ou inhiber la transcription de leur gènes cibles, dépendamment du contexte cellulaire. Dans les dernières années, beaucoup d'études ont été effectuées sur *Klf4*, entre autres parce qu'il est un des quatre facteurs clés permettant l'induction des cellules souches pluripotentes (iPSCs)³⁶¹. Globalement, l'expression de *Klf4* est liée à un arrêt prolifératif³⁶²⁻³⁶⁴, que ce soit dans le cas de la différenciation cellulaire terminale, dans le maintien de la pluripotence des cellules souches³⁶⁵, ou dans la réponse aux dommages à l'ADN³⁶⁶. Par exemple, *Klf4* est impliqué dans la différenciation terminale des kératinocytes³⁶⁷ et son expression est nécessaire à l'induction de la formation de la barrière épidermique par les glucocorticoïdes pendant le développement embryonnaire³⁶⁸⁻³⁷⁰. Il est également associé à l'arrêt prolifératif et à la différenciation terminale des cellules de l'épithélium intestinal^{371,372} et joue différents rôles dans les cellules rénales, érythrocytes, cellules

endothéliales, etc.³⁵⁶ Dans la réponse aux dommages à l'ADN, il est parfois inhibiteur, parfois activateur de l'apoptose³⁵⁶. Son rôle dépend donc fortement du contexte cellulaire dans lequel il est exprimé.

Dans le cas des cTEC, son expression semble liée à une diminution des taux de thymopoïèse. En effet, lorsque le thymus est en pleine croissance, soit dans la période post-natale ou pendant la régénération postpartum précoce, l'expression de *Klf4* est minimale (voir Figure 4.6A et E, p.110). À l'inverse, son expression est maximale alors que le thymus subit une involution rapide pendant la puberté (vers 2 mois chez la souris). Les mâles montrent une expression plus forte de *Klf4* que les femelles et les mâles castrés chez l'adulte (à 6 mois, Figure 4.6F, p.110), qui corrèle négativement avec les taux de prolifération des cTEC (Figures 2.1B à D, p.42) et le potentiel régénératif du thymus suite à l'ablation des cTEC²⁶⁴, qui varient selon la présence des hormones sexuelles.

En conditions normales chez la femelle adulte (6 mois), l'expression de *Foxn1* dans les cTEC quiescentes (*label-retaining cells*, LRC) est plus élevée que dans les cTEC non quiescentes (non-LRC), alors que *Klf4* montre une tendance opposée (voir Figure 5.1A, p.125). Comme l'expression de *Klf4* est habituellement liée à la répression de la prolifération cellulaire, ces résultats sont à première vue contradictoires. Il se pourrait cependant que l'expression plus faible de *Klf4* dans les cTEC quiescentes soit nécessaire afin de leur permettre d'augmenter rapidement leur prolifération lors d'une insulte tissulaire (Figure 5.1B, p.125).

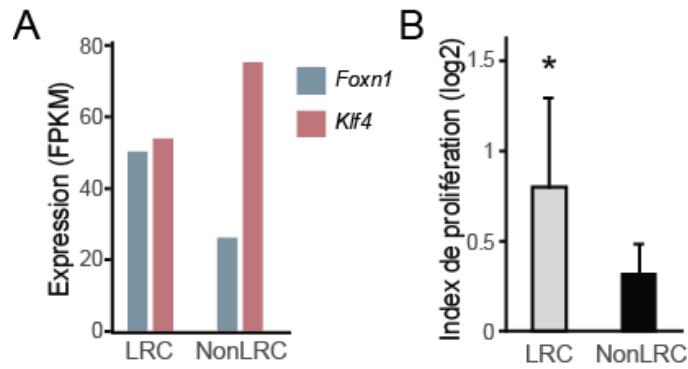


Figure 5.1 | *Klf4* est associé à une prolifération limitée pendant la régénération post-irradiation

(A) Expression de *Foxn1* et *Klf4* dans les cTEC quiescentes (LRC) et non-quiescentes (NonLRC) en conditions physiologiques. (B) Index de prolifération pendant la régénération précoce suivant une irradiation sub-létale (données tirées de la Figure 3.3, p.74).

Le rôle de *Klf4* dans les TEC n'a jamais été étudié jusqu'à ce jour. Nos résultats suggèrent qu'un des effets *Klf4* est d'inhiber l'expression de *Foxn1* dans les cTEC. En effet, le promoteur de *Foxn1* contient plusieurs sites de liaison pour *Klf4* (Figure 4.6C, p.110), et son expression corrèle négativement avec l'expression de *Foxn1* pendant la régénération thymique postpartum (Figure 4.6D, p.110). Comme les KLFs peuvent interagir directement avec les récepteurs nucléaires³⁷³, il est possible que *Klf4* agisse comme médiateur des récepteurs d'hormones sexuelles dans les cTEC. Il sera intéressant de déterminer les gènes régulés par *Klf4* dans les cTEC, afin de confirmer que *Foxn1* est une de ces cibles transcriptionnelles, et de déterminer s'il régule d'autres gènes impliqués dans la thymopoïèse. Enfin, il sera intéressant de comprendre comment l'expression de *Klf4* dans les TEC influence l'involution thymique liée à l'âge ou induite par l'injection d'hormones sexuelles, mâles ou femelles.

Références

1. Caruso, C. *et al.* Mechanisms of immunosenescence. *Immun. Ageing A* **6**, 10 (2009).
2. Aw, D., Silva, A. B. & Palmer, D. B. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* **120**, 435–446 (2007).
3. Palmer, D. B. The Effect of Age on Thymic Function. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
4. Parham. *The immune system*. (Garland science, 2009).
5. Sandel, P. C. & Monroe, J. G. Negative Selection of Immature B Cells by Receptor Editing or Deletion Is Determined by Site of Antigen Encounter. *Immunity* **10**, 289–299 (1999).
6. Zhu, J. & Paul, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557–1569 (2008).
7. Lepletier, A., Alsharif, A. & Chidgey, A. P. Inflammation and Thymus Ageing. *Front. Horm. Res.* **48**, 19–36 (2017).
8. Abramson, J. & Anderson, G. Thymic Epithelial Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 85–118 (2017).
9. Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E. & Petrie, H. T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp. Med.* **194**, 127–134 (2001).
10. Mori, K., Itoi, M., Tsukamoto, N., Kubo, H. & Amagai, T. The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma. *Int. Immunol.* **19**, 745–753 (2007).
11. Calderón, L. & Boehm, T. Synergistic, Context-Dependent, and Hierarchical Functions of Epithelial Components in Thymic Microenvironments. *Cell* **149**, 159–172 (2012).
12. Nagasawa, T. *et al.* Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* **382**, 635–638 (1996).
13. Liu, C. *et al.* Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* **108**, 2531–2539 (2006).
14. Liu, C. *et al.* The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi. *Blood* **105**, 31–39 (2005).
15. Schwarz, B. A. *et al.* Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 2008–2017 (2007).
16. Rossi, F. M. V. *et al.* Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat. Immunol.* **6**, 626–634 (2005).
17. Gossens, K. *et al.* Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *J. Exp. Med.* **206**, 761–778 (2009).

18. Buono, M. *et al.* A dynamic niche provides Kit ligand in a stage-specific manner to the earliest thymocyte progenitors. *Nat. Cell Biol.* **18**, 157–167 (2016).
19. Uehara, S., Grinberg, A., Farber, J. M. & Love, P. E. A Role for CCR9 in T Lymphocyte Development and Migration. *J. Immunol.* **168**, 2811–2819 (2002).
20. Foss, D. L., Donskoy, E. & Goldschneider, I. The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J. Exp. Med.* **193**, 365–374 (2001).
21. Peaudecerf, L. *et al.* Thymocytes may persist and differentiate without any input from bone marrow progenitors. *J. Exp. Med.* **209**, 1401–1408 (2012).
22. Martins, V. C. *et al.* Thymus-autonomous T cell development in the absence of progenitor import. *J. Exp. Med.* **209**, 1409–1417 (2012).
23. Porritt, H. E., Gordon, K. & Petrie, H. T. Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J. Exp. Med.* **198**, 957–962 (2003).
24. Plotkin, J., Prockop, S. E., Lepique, A. & Petrie, H. T. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 4521–4527 (2003).
25. Trampont, P. C. *et al.* CXCR4 acts as a costimulator during thymic β selection. *Nat. Immunol.* **11**, 162–170 (2010).
26. Dudley, E. C., Petrie, H. T., Shah, L. M., Owen, M. J. & Hayday, A. C. T cell receptor β chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* **1**, 83–93 (1994).
27. Pénit, C., Lucas, B. & Vasseur, F. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **154**, 5103–5113 (1995).
28. Wiele, C. J. V. D. *et al.* Thymocytes between the β -Selection and Positive Selection Checkpoints Are Nonresponsive to IL-7 as Assessed by STAT-5 Phosphorylation. *J. Immunol.* **172**, 4235–4244 (2004).
29. Janas, M. L. *et al.* Thymic development beyond β -selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4. *J. Exp. Med.* **207**, 247–261 (2010).
30. Gleimer, M. & Boehmer, H. von. Thymocyte Selection: Chemokine Signaling Is Not Only about the Destination. *Curr. Biol.* **20**, R316–R318 (2010).
31. Benz, C., Heinzl, K. & Bleul, C. C. Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3652–3663 (2004).
32. Nakagawa, Y. *et al.* Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary T cell receptor α rearrangement in cortical thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 20572–20577 (2012).

33. Huang, C. & Kanagawa, O. Ordered and coordinated rearrangement of the TCR alpha locus: role of secondary rearrangement in thymic selection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 2597–2601 (2001).
34. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 833–844 (2009).
35. Melichar, H. J., Ross, J. O., Herzmark, P., Hogquist, K. A. & Robey, E. A. Distinct temporal patterns of T cell receptor signaling during positive versus negative selection in situ. *Sci. Signal.* **6**, ra92 (2013).
36. He, X. *et al.* The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature* **433**, 826–833 (2005).
37. Naito, T., Tanaka, H., Naoe, Y. & Taniuchi, I. Transcriptional control of T-cell development. *Int. Immunol.* **23**, 661–668 (2011).
38. Sato, T. *et al.* Dual functions of Runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes. *Immunity* **22**, 317–328 (2005).
39. Taniuchi, I. *et al.* Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* **111**, 621–633 (2002).
40. Kloetzel, P.-M. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1695**, 225–233 (2004).
41. Nitta, T. *et al.* Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity* **32**, 29–40 (2010).
42. Murata, S. *et al.* Regulation of CD8+ T Cell Development by Thymus-Specific Proteasomes. *Science* **316**, 1349–1353 (2007).
43. Murata, S., Takahama, Y. & Tanaka, K. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 192–196 (2008).
44. Sasaki, K. *et al.* Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8+ T cells. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
45. Honey, K., Nakagawa, T., Peters, C. & Rudensky, A. Cathepsin L Regulates CD4+ T Cell Selection Independently of Its Effect on Invariant Chain A Role in the Generation of Positively Selecting Peptide Ligands. *J. Exp. Med.* **195**, 1349–1358 (2002).
46. Gommeaux, J. *et al.* Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes. *Eur. J. Immunol.* **39**, 956–964 (2009).
47. Cheunsuk, S. *et al.* Prss16 is not required for T-cell development. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 789–796 (2005).
48. Tze, L. E. *et al.* CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J. Exp. Med.* **208**, 149–165 (2011).
49. von Rohrscheidt, J. *et al.* Thymic CD4 T cell selection requires attenuation of March8-mediated MHCII turnover in cortical epithelial cells through CD83. *J. Exp. Med.* **213**, 1685–1694 (2016).

50. Fujimoto, Y. *et al.* CD83 expression influences CD4⁺ T cell development in the thymus. *Cell* **108**, 755–767 (2002).
51. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1101–1111 (2004).
52. Nedjic, J., Aichinger, M., Mizushima, N. & Klein, L. Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 92–97 (2009).
53. Münz, C. Enhancing immunity through autophagy. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 423–449 (2009).
54. Cowan, J. E. *et al.* Differential requirement for CCR4 and CCR7 during the development of innate and adaptive $\alpha\beta$ T cells in the adult thymus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **193**, 1204–1212 (2014).
55. Kwan, J. & Killeen, N. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 3999–4007 (2004).
56. Kurobe, H. *et al.* CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* **24**, 165–177 (2006).
57. Suzuki, G. *et al.* Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus. *Int. Immunol.* **10**, 1049–1056 (1998).
58. Stritesky, G. L. *et al.* Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 4679–4684 (2013).
59. McCaughtry, T. M., Baldwin, T. A., Wilken, M. S. & Hogquist, K. A. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J. Exp. Med.* **205**, 2575–2584 (2008).
60. Melichar, H. J., Ross, J. O., Taylor, K. T. & Robey, E. A. Stable interactions and sustained TCR signaling characterize thymocyte-thymocyte interactions that support negative selection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 1057–1061 (2015).
61. Irla, M., Hollander, G. & Reith, W. Control of central self-tolerance induction by autoreactive CD4⁺ thymocytes. *Trends Immunol.* **31**, 71–79 (2010).
62. St-Pierre, C., Trofimov, A., Brochu, S., Lemieux, S. & Perreault, C. Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195**, 498–506 (2015).
63. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* **298**, 1395–1401 (2002).
64. Chan, A. & Anderson, M. S. Central tolerance to self revealed by the autoimmune regulator. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1356**, 80–89 (2015).
65. Lei, Y. *et al.* Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* **208**, 383–394 (2011).

66. Gallegos, A. M. & Bevan, M. J. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J. Exp. Med.* **200**, 1039–1049 (2004).
67. Ardouin, L. *et al.* Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. *Immunity* **45**, 305–318 (2016).
68. Li, J., Park, J., Foss, D. & Goldschneider, I. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J. Exp. Med.* **206**, 607–622 (2009).
69. Hadeiba, H. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* **36**, 438–450 (2012).
70. Fujihara, C. *et al.* T cell-B cell thymic cross-talk: maintenance and function of thymic B cells requires cognate CD40-CD40 ligand interaction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **193**, 5534–5544 (2014).
71. Frommer, F. & Waisman, A. B cells participate in thymic negative selection of murine auto-reactive CD4⁺ T cells. *PloS One* **5**, e15372 (2010).
72. Yamano, T. *et al.* Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity* **42**, 1048–1061 (2015).
73. Lu, F.-T. *et al.* Thymic B cells promote thymus-derived regulatory T cell development and proliferation. *J. Autoimmun.* **61**, 62–72 (2015).
74. Chaudhry, M. S., Velardi, E., Dudakov, J. A. & van den Brink, M. R. M. Thymus: the next (re)generation. *Immunol. Rev.* **271**, 56–71 (2016).
75. Rodewald, H.-R. Thymus Organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 355–388 (2008).
76. Bleul, C. C. *et al.* Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* **441**, 992–996 (2006).
77. Rossi, S. W., Jenkinson, W. E., Anderson, G. & Jenkinson, E. J. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* **441**, 988–991 (2006).
78. Ohigashi, I. *et al.* Adult Thymic Medullary Epithelium Is Maintained and Regenerated by Lineage-Restricted Cells Rather Than Bipotent Progenitors. *Cell Rep.* **13**, 1432–1443 (2015).
79. Baik, S., Jenkinson, E. J., Lane, P. J. L., Anderson, G. & Jenkinson, W. E. Generation of both cortical and Aire⁺ medullary thymic epithelial compartments from CD205⁺ progenitors. *Eur. J. Immunol.* **43**, 589–594 (2013).
80. Ribeiro, A. R., Rodrigues, P. M., Meireles, C., Santo, J. P. D. & Alves, N. L. Thymocyte Selection Regulates the Homeostasis of IL-7–Expressing Thymic Cortical Epithelial Cells In Vivo. *J. Immunol.* **191**, 1200–1209 (2013).
81. Mayer, C. E. *et al.* Dynamic spatio-temporal contribution of single β 5t⁺ cortical epithelial precursors to the thymus medulla. *Eur. J. Immunol.* **46**, 846–856 (2016).

82. Rodewald, H.-R., Paul, S., Haller, C., Bluethmann, H. & Blum, C. Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor. *Nature* **414**, 763–768 (2001).
83. Wong, K. *et al.* Multilineage Potential and Self-Renewal Define an Epithelial Progenitor Cell Population in the Adult Thymus. *Cell Rep.* **8**, 1198–1209 (2014).
84. Ulyanchenko, S. *et al.* Identification of a Bipotent Epithelial Progenitor Population in the Adult Thymus. *Cell Rep.* **14**, 2819–2832 (2016).
85. Ucar, A. *et al.* Adult Thymus Contains FoxN1– Epithelial Stem Cells that Are Bipotent for Medullary and Cortical Thymic Epithelial Lineages. *Immunity* **41**, 257–269 (2014).
86. Sekai, M., Hamazaki, Y. & Minato, N. Medullary Thymic Epithelial Stem Cells Maintain a Functional Thymus to Ensure Lifelong Central T Cell Tolerance. *Immunity* **41**, 753–761 (2014).
87. Hamazaki, Y. *et al.* Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin. *Nat. Immunol.* **8**, 304–311 (2007).
88. Onder, L. *et al.* Alternative NF- κ B signaling regulates mTEC differentiation from podoplanin-expressing presursors in the cortico-medullary junction. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2218–2231 (2015).
89. Manley, N. R. & Condie, B. G. Transcriptional Regulation of Thymus Organogenesis and Thymic Epithelial Cell Differentiation. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (ed. Adrian Liston) **Volume 92**, 103–120 (Academic Press, 2010).
90. Revest, J. M., Suniara, R. K., Kerr, K., Owen, J. J. & Dickson, C. Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **167**, 1954–1961 (2001).
91. Dooley, J., Erickson, M., Larochelle, W. J., Gillard, G. O. & Farr, A. G. FGFR2IIIb signaling regulates thymic epithelial differentiation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **236**, 3459–3471 (2007).
92. Heinonen, K. M. *et al.* Wnt4 regulates thymic cellularity through the expansion of thymic epithelial cells and early thymic progenitors. *Blood* **118**, 5163–5173 (2011).
93. Bleul, C. C. & Boehm, T. BMP Signaling Is Required for Normal Thymus Development. *J. Immunol.* **175**, 5213–5221 (2005).
94. Gordon, J., Patel, S. R., Mishina, Y. & Manley, N. R. Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis. *Dev. Biol.* **339**, 141–154 (2010).
95. Balciunaite, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat. Immunol.* **3**, 1102–1108 (2002).
96. Liang, C.-C. *et al.* Thymic epithelial β -catenin is required for adult thymic homeostasis and function. *Immunol. Cell Biol.* **91**, 511–523 (2013).

97. Osada, M. *et al.* DKK1 mediated inhibition of Wnt signaling in postnatal mice leads to loss of TEC progenitors and thymic degeneration. *PloS One* **5**, e9062 (2010).
98. Nehls, M. *et al.* Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* **272**, 886–889 (1996).
99. Chen, L., Xiao, S. & Manley, N. R. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood* **113**, 567–574 (2009).
100. Žuklys, S. *et al.* Foxn1 regulates key target genes essential for T cell development in postnatal thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* **17**, 1206–1215 (2016).
101. Rode, I. *et al.* Foxn1 Protein Expression in the Developing, Aging, and Regenerating Thymus. *J. Immunol.* **195**, 5678–5687 (2015).
102. Manley, N. R. & Capecchi, M. R. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Dev. Camb. Engl.* **121**, 1989–2003 (1995).
103. Manley, N. R. & Capecchi, M. R. HoxGroup 3 Paralogs Regulate the Development and Migration of the Thymus, Thyroid, and Parathyroid Glands. *Dev. Biol.* **195**, 1–15 (1998).
104. Deutsch, U., Dressler, G. R. & Gruss, P. Pax 1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* **53**, 617–625 (1988).
105. Hetzer-Egger, C. *et al.* Thymopoiesis requires Pax9 function in thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1175–1181 (2002).
106. Zou, D. *et al.* Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1. *Dev. Biol.* **293**, (2006).
107. Xu, P.-X. *et al.* Eya1 is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Dev. Camb. Engl.* **129**, 3033–3044 (2002).
108. Jerome, L. A. & Papaioannou, V. E. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat. Genet.* **27**, 286–291 (2001).
109. Xu, H., Cerrato, F. & Baldini, A. Timed mutation and cell-fate mapping reveal reiterated roles of Tbx1 during embryogenesis, and a crucial function during segmentation of the pharyngeal system via regulation of endoderm expansion. *Development* **132**, 4387–4395 (2005).
110. Alves, N. L. *et al.* Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments. *Eur. J. Immunol.* **44**, 16–22 (2014).
111. Goldfarb, Y. *et al.* HDAC3 Is a Master Regulator of mTEC Development. *Cell Rep.* **15**, 651–665 (2016).
112. Kernfeld, E. M. *et al.* A Single-Cell Transcriptomic Atlas of Thymus Organogenesis Resolves Cell Types and Developmental Maturation. *Immunity* **48**, 1258–1270.e6 (2018).
113. Bornstein, C. *et al.* Single-cell mapping of the thymic stroma identifies IL-25-producing tuft epithelial cells. *Nature* **1** (2018). doi:10.1038/s41586-018-0346-1

114. Rossi, S. W. *et al.* RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J. Exp. Med.* **204**, 1267–1272 (2007).
115. Gray, D., Abramson, J., Benoist, C. & Mathis, D. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J. Exp. Med.* **204**, 2521–2528 (2007).
116. Metzger, T. C. *et al.* Lineage Tracing and Cell Ablation Identify a Post-Aire-Expressing Thymic Epithelial Cell Population. *Cell Rep.* **5**, 166–179 (2013).
117. Yano, M. *et al.* Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J. Exp. Med.* **205**, 2827–2838 (2008).
118. Hikosaka, Y. *et al.* The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. *Immunity* **29**, 438–450 (2008).
119. Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K. & Bleul, C. C. Thymic Medullary Epithelial Cell Differentiation, Thymocyte Emigration, and the Control of Autoimmunity Require Lympho–Epithelial Cross Talk via LT β R. *J. Exp. Med.* **198**, 757–769 (2003).
120. Lkhagvasuren, E., Sakata, M., Ohigashi, I. & Takahama, Y. Lymphotoxin β Receptor Regulates the Development of CCL21-Expressing Subset of Postnatal Medullary Thymic Epithelial Cells. *J. Immunol.* **190**, 5110–5117 (2013).
121. Desanti, G. E. *et al.* Developmentally Regulated Availability of RANKL and CD40 Ligand Reveals Distinct Mechanisms of Fetal and Adult Cross-Talk in the Thymus Medulla. *J. Immunol.* **189**, 5519–5526 (2012).
122. Akiyama, T. *et al.* The Tumor Necrosis Factor Family Receptors RANK and CD40 Cooperatively Establish the Thymic Medullary Microenvironment and Self-Tolerance. *Immunity* **29**, 423–437 (2008).
123. Irla, M. *et al.* Autoantigen-Specific Interactions with CD4+ Thymocytes Control Mature Medullary Thymic Epithelial Cell Cellularity. *Immunity* **29**, 451–463 (2008).
124. Satoh, R. *et al.* Requirement of Stat3 Signaling in the Postnatal Development of Thymic Medullary Epithelial Cells. *PLoS Genet.* **12**, e1005776 (2016).
125. Miller, C. N. *et al.* Thymic tuft cells promote an IL-4-enriched medulla and shape thymocyte development. *Nature* **1** (2018). doi:10.1038/s41586-018-0345-2
126. Takahama, Y., Ohigashi, I., Baik, S. & Anderson, G. Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 295–305 (2017).
127. Chilukuri, R. V. E., Patel, V. K., Martinez, M., Guyden, J. C. & Samms, M. D. The Antigenic Determinant That Defines Thymic Nurse Cells Is Expressed by Thymic Epithelial Progenitor Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **2**, (2014).
128. Pignata, C. *et al.* Congenital Alopecia and nail dystrophy associated with severe functional T-cell immunodeficiency in two sibs. *Am. J. Med. Genet.* **65**, 167–170 (1996).
129. Mitchell, W. A., Lang, P. O. & Aspinall, R. Tracing thymic output in older individuals. *Clin. Exp. Immunol.* **161**, 497–503 (2010).

130. Lynch, H. E. *et al.* Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* **30**, 366–373 (2009).
131. Shanley, D. P., Aw, D., Manley, N. R. & Palmer, D. B. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. *Trends Immunol.* **30**, 374–381 (2009).
132. Dooley, J. & Liston, A. Molecular control over thymic involution: From cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1073–1079 (2012).
133. King, C. C. *et al.* Viral infection of the thymus. *J. Virol.* **66**, 3155–3160 (1992).
134. Gao, Y.-N. *et al.* Suspension of thymic emigration promotes the maintenance of antigen-specific memory T cells and the recall responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **454**, 275–281 (2014).
135. Dowling, M. R. & Hodgkin, P. D. Why does the thymus involute? A selection-based hypothesis. *Trends Immunol.* **30**, 295–300 (2009).
136. Martins, V. C. *et al.* Cell competition is a tumour suppressor mechanism in the thymus. *Nature* **509**, 465–470 (2014).
137. Bosch, M., Khan, F. M. & Storek, J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* **19**, 324–335 (2012).
138. Mackall, C. L. *et al.* Age, thymopoiesis, and CD4⁺ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **332**, 143–149 (1995).
139. Hakim, F. T. *et al.* Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J. Clin. Invest.* **115**, 930–939 (2005).
140. Weinberg, K. *et al.* The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **1**, 18–23 (1995).
141. Wils, E.-J. *et al.* Insufficient recovery of thymopoiesis predicts for opportunistic infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica* **96**, 1846–1854 (2011).
142. Gray, D. H. D. *et al.* Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* **108**, 3777–3785 (2006).
143. Yang, H., Youm, Y.-H. & Dixit, V. D. Inhibition of Thymic Adipogenesis by Caloric Restriction Is Coupled with Reduction in Age-Related Thymic Involution. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 3040–3052 (2009).
144. Aw, D., Silva, A. B., Maddick, M., Von Zglinicki, T. & Palmer, D. B. Architectural changes in the thymus of aging mice. *Aging Cell* **7**, 158–167 (2008).
145. Youm, Y.-H., Horvath, T. L., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A. & Dixit, V. D. Prolongevity hormone FGF21 protects against immune senescence by delaying age-related thymic involution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 1026–1031 (2016).
146. Dixit, V. D. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 521–528 (2010).
147. Sutherland, J. S. *et al.* Activation of Thymic Regeneration in Mice and Humans following Androgen Blockade. *J. Immunol.* **175**, 2741–2753 (2005).

148. Gui, J., Mustachio, L. M., Su, D.-M. & Craig, R. W. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. *Aging Dis.* **3**, 280–290 (2012).
149. Tibbetts, T. A., DeMayo, F., Rich, S., Conneely, O. M. & O'Malley, B. W. Progesterone receptors in the thymus are required for thymic involution during pregnancy and for normal fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 12021–12026 (1999).
150. Zoller, A. L., Schnell, F. J. & Kersh, G. J. Murine pregnancy leads to reduced proliferation of maternal thymocytes and decreased thymic emigration. *Immunology* **121**, 207–215 (2007).
151. Rijhsinghani, A. G., Thompson, K., Bhatia, S. K. & Waldschmidt, T. J. Estrogen Blocks Early T Cell Development in the Thymus. *Am. J. Reprod. Immunol.* **36**, 269–277 (1996).
152. Lai, K.-P. *et al.* Targeting thymic epithelia AR enhances T-cell reconstitution and bone marrow transplant grafting efficacy. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **27**, 25–37 (2013).
153. Velardi, E. *et al.* Sex steroid blockade enhances thymopoiesis by modulating Notch signaling. *J. Exp. Med.* **211**, 2341–2349 (2014).
154. Olsen, N. J., Olson, G., Viselli, S. M., Gu, X. & Kovacs, W. J. Androgen Receptors in Thymic Epithelium Modulate Thymus Size and Thymocyte Development. *Endocrinology* **142**, 1278–1283 (2001).
155. Staples, J. E. *et al.* Estrogen Receptor α Is Necessary in Thymic Development and Estradiol-Induced Thymic Alterations. *J. Immunol.* **163**, 4168–4174 (1999).
156. Griffith, A. V., Fallahi, M., Venables, T. & Petrie, H. T. Persistent degenerative changes in thymic organ function revealed by an inducible model of organ regrowth. *Aging Cell* **11**, 169–177 (2012).
157. Min, H., Montecino-Rodriguez, E. & Dorshkind, K. Reassessing the role of growth hormone and sex steroids in thymic involution. *Clin. Immunol.* **118**, 117–123 (2006).
158. Roshan, S., Nader, S. & Orlander, P. Review: Ageing and hormones. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**, 210–213 (1999).
159. Anz, D. *et al.* Activation of Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Causes Rapid Involution of the Thymus. *J. Immunol.* **182**, 6044–6050 (2009).
160. Taniguchi, T. & Takaoka, A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 111–116 (2002).
161. Gruver, A. L. & Sempowski, G. D. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 915–923 (2008).
162. Hick, R. W., Gruver, A. L., Ventevogel, M. S., Haynes, B. F. & Sempowski, G. D. Leptin Selectively Augments Thymopoiesis in Leptin Deficiency and Lipopolysaccharide-Induced Thymic Atrophy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 169–176 (2006).

163. Purton, J. F. *et al.* Expression of the glucocorticoid receptor from the 1A promoter correlates with T lymphocyte sensitivity to glucocorticoid-induced cell death. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 3816–3824 (2004).
164. Zubkova, I., Mostowski, H. & Zaitseva, M. Up-regulation of IL-7, stromal-derived factor-1 alpha, thymus-expressed chemokine, and secondary lymphoid tissue chemokine gene expression in the stromal cells in response to thymocyte depletion: implication for thymus reconstitution. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 2321–2330 (2005).
165. Hoffman-Goetz, L. & Zajchowski, S. In vitro apoptosis of lymphocytes after exposure to levels of corticosterone observed following submaximal exercise. *J. Sports Med. Phys. Fitness* **39**, 269–274 (1999).
166. Tarcic, N., Ovadia, H., Weiss, D. W. & Weidenfeld, J. Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *J. Neuroimmunol.* **82**, 40–46 (1998).
167. Rafei, M., Dumont-Lagace, M., Rouette, A. & Perreault, C. Interleukin-21 Accelerates Thymic Recovery from Glucocorticoid-Induced Atrophy. *PLoS ONE* **8**, (2013).
168. Ashwell, J. D., Lu, F. W. & Vacchio, M. S. Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 309–345 (2000).
169. Howard, J. K. *et al.* Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.* **104**, 1051–1059 (1999).
170. Gentil Dit Maurin, A. *et al.* Developmental regulation of p53-dependent radiation-induced thymocyte apoptosis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **179**, 30–38 (2015).
171. Fletcher, A. L. *et al.* Ablation and regeneration of tolerance-inducing medullary thymic epithelial cells after cyclosporine, cyclophosphamide, and dexamethasone treatment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 823–831 (2009).
172. Sano, S. *et al.* Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity* **15**, 261–273 (2001).
173. Grassinger, J. *et al.* Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with alpha9beta1 and alpha4beta1 integrins. *Blood* **114**, 49–59 (2009).
174. Griffith, A. V. *et al.* Metabolic Damage and Premature Thymus Aging Caused by Stromal Catalase Deficiency. *Cell Rep.* **12**, 1071–1079 (2015).
175. Burd, C. E. *et al.* Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model. *Cell* **152**, 340–351 (2013).
176. Cheng, S. & Rodier, F. Manipulating senescence in health and disease: emerging tools. *Cell Cycle* **14**, 1613–1614 (2015).
177. Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* **192**, 547–556 (2011).

178. Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657–667 (2008).
179. Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* **31**, 722–733 (2014).
180. Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 685–705 (2013).
181. Dumont-Lagacé, M., Brochu, S., St-Pierre, C. & Perreault, C. Adult Thymic Epithelium Contains Nonsenescent Label-Retaining Cells. *J. Immunol.* **192**, 2219–2226 (2014).
182. Meireles, C. *et al.* Thymic crosstalk restrains the pool of cortical thymic epithelial cells with progenitor properties. *Eur. J. Immunol.* **47**, 958–969 (2017).
183. Kim, M.-J., Miller, C. M., Shadrach, J. L., Wagers, A. J. & Serwold, T. Young, Proliferative Thymic Epithelial Cells Engraft and Function in Aging Thymuses. *J. Immunol.* 1403158 (2015). doi:10.4049/jimmunol.1403158
184. Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J. & Scollay, R. The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* **2**, 3–12 (1990).
185. Li, L. *et al.* Cellular mechanism of thymic involution. *Scand. J. Immunol.* **57**, 410–422 (2003).
186. Konkel, J. E., Jin, W., Abbatiello, B., Grainger, J. R. & Chen, W. Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E465–E473 (2014).
187. Hauri-Hohl, M., Zuklys, S., Holländer, G. A. & Ziegler, S. F. A regulatory role for TGF- β signaling in the establishment and function of the thymic medulla. *Nat. Immunol.* **15**, 554–561 (2014).
188. Bauer, M. E., Jeckel, C. M. M. & Luz, C. The Role of Stress Factors during Aging of the Immune System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1153**, 139–152
189. Castle, S. C. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **31**, 578–585 (2000).
190. Liu, J., Wang, S., Liu, H., Yang, L. & Nan, G. The monitoring biomarker for immune function of lymphocytes in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* **94**, 177–182 (1997).
191. Globerson, A. & Effros, R. B. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol. Today* **21**, 515–521 (2000).
192. Kohler, S. *et al.* Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4⁺ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1987–1994 (2005).
193. Hannet, I., Erkeller-Yuksel, F., Lydyard, P., Deneys, V. & DeBruyère, M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol. Today* **13**, 215, 218 (1992).
194. Zhang, X. *et al.* Aging leads to disturbed homeostasis of memory phenotype CD8(+) cells. *J. Exp. Med.* **195**, 283–293 (2002).

195. Batliwalla, F., Monteiro, J., Serrano, D. & Gregersen, P. K. Oligoclonality of CD8+ T cells in health and disease: aging, infection, or immune regulation? *Hum. Immunol.* **48**, 68–76 (1996).
196. Surh, C. D. & Sprent, J. Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? *J. Exp. Med.* **192**, F9–F14 (2000).
197. Mo, R. *et al.* T cell chemokine receptor expression in aging. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 895–904 (2003).
198. Prelog, M. Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? *Autoimmun. Rev.* **5**, 136–139 (2006).
199. Coder, B. D., Wang, H., Ruan, L. & Su, D.-M. Thymic involution perturbs negative selection leading to autoreactive T cells that induce chronic inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 5825–5837 (2015).
200. Della Bella, S. *et al.* Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **122**, 220–228 (2007).
201. Ginaldi, L. *et al.* Immunological changes in the elderly. *Aging Milan Italy* **11**, 281–286 (1999).
202. Krishnaraj, R. Senescence and cytokines modulate the NK cell expression. *Mech. Ageing Dev.* **96**, 89–101 (1997).
203. Licastro, F. *et al.* Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun. Ageing A* **2**, 8 (2005).
204. Franceschi, C. *et al.* Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **908**, 244–254 (2000).
205. Zook, E. C. *et al.* Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood* **118**, 5723–5731 (2011).
206. Reis, M. D. D. S. *et al.* Decline of FOXN1 gene expression in human thymus correlates with age: possible epigenetic regulation. *Immun. Ageing A* **12**, 18 (2015).
207. O'Neill, K. E. *et al.* Foxn1 Is Dynamically Regulated in Thymic Epithelial Cells during Embryogenesis and at the Onset of Thymic Involution. *PLoS ONE* **11**, (2016).
208. Bredenkamp, N., Nowell, C. S. & Blackburn, C. C. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development* **141**, 1627–1637 (2014).
209. Bredenkamp, N. *et al.* An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **16**, 902–908 (2014).
210. Sutherland, J. S. *et al.* Enhanced immune system regeneration in humans following allogeneic or autologous hemopoietic stem cell transplantation by temporary sex steroid blockade. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 1138–1149 (2008).
211. Dudakov, J. A. *et al.* Sex steroid ablation enhances hematopoietic recovery following cytotoxic antineoplastic therapy in aged mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 7084–7094 (2009).

212. Goldberg, G. L. *et al.* Luteinizing hormone-releasing hormone enhances T cell recovery following allogeneic bone marrow transplantation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 5846–5854 (2009).
213. Dudakov, J. A., Goldberg, G. L., Reiseger, J. J., Chidgey, A. P. & Boyd, R. L. Withdrawal of sex steroids reverses age- and chemotherapy-related defects in bone marrow lymphopoiesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 6247–6260 (2009).
214. Khong, D. M. *et al.* Enhanced hematopoietic stem cell function mediates immune regeneration following sex steroid blockade. *Stem Cell Rep.* **4**, 445–458 (2015).
215. Williams, K. M. *et al.* CCL25 increases thymopoiesis after androgen withdrawal. *Blood* **112**, 3255–3263 (2008).
216. Park, H.-J. *et al.* Up-regulation of VEGF expression by NGF that enhances reparative angiogenesis during thymic regeneration in adult rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1462–1472 (2007).
217. Cuddihy, A. R. *et al.* Rapid thymic reconstitution following bone marrow transplantation in neonatal mice is VEGF-dependent. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **18**, 683–689 (2012).
218. Finch, P. W. & Rubin, J. S. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Adv. Cancer Res.* **91**, 69–136 (2004).
219. Min, D. *et al.* Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* **99**, 4592–4600 (2002).
220. Alpdogan, O. *et al.* Keratinocyte growth factor (KGF) is required for postnatal thymic regeneration. *Blood* **107**, 2453–2460 (2006).
221. Rossi, S. W. *et al.* Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells. *Blood* **109**, 3803–3811 (2007).
222. Erickson, M. *et al.* Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. *Blood* **100**, 3269–3278 (2002).
223. Chu, Y.-W. *et al.* Exogenous insulin-like growth factor 1 enhances thymopoiesis predominantly through thymic epithelial cell expansion. *Blood* **112**, 2836–2846 (2008).
224. Bar-Dayán, Y. & Small, M. Effect of bovine growth hormone administration on the pattern of thymic involution in mice. *Thymus* **23**, 95–101 (1994).
225. Murphy, W. J., Durum, S. K., Anver, M. R. & Longo, D. L. Immunologic and hematologic effects of neuroendocrine hormones. Studies on DW/J dwarf mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **148**, 3799–3805 (1992).
226. Chen, B. J., Cui, X., Sempowski, G. D. & Chao, N. J. Growth hormone accelerates immune recovery following allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation in mice. *Exp. Hematol.* **31**, 953–958 (2003).

227. Napolitano, L. A. *et al.* Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults. *J. Clin. Invest.* **118**, 1085–1098 (2008).
228. Hauri-Hohl, M. M. *et al.* TGF-beta signaling in thymic epithelial cells regulates thymic involution and postirradiation reconstitution. *Blood* **112**, 626–634 (2008).
229. Rafei, M., Rouette, A., Brochu, S., Vanegas, J. R. & Perreault, C. Differential effects of γ c cytokines on postselection differentiation of CD8 thymocytes. *Blood* **121**, 107–117 (2013).
230. Freedden-Jeffry, U. von *et al.* Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* **181**, 1519–1526 (1995).
231. Alpdogan, O. & van den Brink, M. R. M. IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. *Trends Immunol.* **26**, 56–64 (2005).
232. Snyder, K. M., Mackall, C. L. & Fry, T. J. IL-7 in allogeneic transplant: clinical promise and potential pitfalls. *Leuk. Lymphoma* **47**, 1222–1228 (2006).
233. Sinha, M. L., Fry, T. J., Fowler, D. H., Miller, G. & Mackall, C. L. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* **100**, 2642–2649 (2002).
234. Dudakov, J. A. *et al.* Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* **336**, 91–95 (2012).
235. Pan, B. *et al.* Acute ablation of DP thymocytes induces up-regulation of IL-22 and Foxn1 in TECs. *Clin. Immunol.* **150**, 101–108 (2014).
236. Tormo, A. *et al.* Interleukin-21 promotes thymopoiesis recovery following hematopoietic stem cell transplantation. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 120 (2017).
237. Lai, L. & Jin, J. Generation of thymic epithelial cell progenitors by mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 3012–3020 (2009).
238. Parent, A. V. *et al.* Generation of Functional Thymic Epithelium from Human Embryonic Stem Cells that Supports Host T Cell Development. *Cell Stem Cell* **13**, (2013).
239. Sun, X. *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into thymic epithelial progenitor-like cells reconstitutes the thymic microenvironment in vivo. *Cell Stem Cell* **13**, 230–236 (2013).
240. Soh, C.-L. *et al.* FOXP1 (GFP/w) reporter hESCs enable identification of integrin- β 4, HLA-DR, and EpCAM as markers of human PSC-derived FOXP1(+) thymic epithelial progenitors. *Stem Cell Rep.* **2**, 925–937 (2014).
241. Inami, Y. *et al.* Differentiation of induced pluripotent stem cells to thymic epithelial cells by phenotype. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 314–321 (2011).
242. Flomerfelt, F. A. *et al.* Tbeta modulates thymic stromal cell proliferation and thymus function. *J. Exp. Med.* **207**, 2521–2532 (2010).
243. Kont, V. *et al.* Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol. Immunol.* **45**, 25–33 (2008).
244. Bonfanti, P. *et al.* Microenvironmental reprogramming of thymic epithelial cells to skin multipotent stem cells. *Nature* **466**, 978–982 (2010).

245. Pinto, S. *et al.* An Organotypic Coculture Model Supporting Proliferation and Differentiation of Medullary Thymic Epithelial Cells and Promiscuous Gene Expression. *J. Immunol.* **190**, 1085–1093 (2013).
246. Marshall, D. *et al.* T cell generation including positive and negative selection ex vivo in a three-dimensional matrix. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **12**, 565–574 (2003).
247. Fan, Y. *et al.* Bioengineering Thymus Organoids to Restore Thymic Function and Induce Donor-Specific Immune Tolerance to Allografts. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **23**, 1262–1277 (2015).
248. Wertheimer, T. *et al.* Production of BMP4 by endothelial cells is crucial for endogenous thymic regeneration. *Sci. Immunol.* **3**, (2018).
249. Seandel, M. *et al.* Generation of a functional and durable vascular niche by the adenoviral E4ORF1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19288–19293 (2008).
250. Zakrzewski, J. L. *et al.* Adoptive transfer of T-cell precursors enhances T-cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Nat. Med.* **12**, 1039–1047 (2006).
251. Whitacre, C. C. Sex differences in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* **2**, 777–780 (2001).
252. Fish, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 737–744 (2008).
253. Markle, J. G. & Fish, E. N. SeXX matters in immunity. *Trends Immunol.* **35**, 97–104 (2014).
254. Danska, J. S. Sex Matters for Mechanism. *Sci. Transl. Med.* **6**, 258fs40-258fs40 (2014).
255. Markle, J. G. M. *et al.* Sex Differences in the Gut Microbiome Drive Hormone-Dependent Regulation of Autoimmunity. *Science* **339**, 1084–1088 (2013).
256. Markle, J. G., Frank, D. N., Adeli, K., von Bergen, M. & Danska, J. S. Microbiome manipulation modifies sex-specific risk for autoimmunity. *Gut Microbes* **5**, 485–493 (2014).
257. Furman, D. *et al.* Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 869–874 (2014).
258. Yang, Z. *et al.* Female resistance to pneumonia identifies lung macrophage nitric oxide synthase-3 as a therapeutic target. *eLife* **3**, (2014).
259. Yurkovetskiy, L. *et al.* Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity* **39**, 400–412 (2013).
260. Montecino-Rodriguez, E., Berent-Maoz, B. & Dorshkind, K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J. Clin. Invest.* **123**, 958–965 (2013).
261. Ventevogel, M. S. & Sempowski, G. D. Thymic rejuvenation and aging. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 516–522 (2013).
262. Olsen, N. J. & Kovacs, W. J. Evidence that androgens modulate human thymic T cell output. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* **59**, 32–35 (2011).

263. Ardiani, A. *et al.* Combination therapy with a second-generation androgen receptor antagonist and a metastasis vaccine improves survival in a spontaneous prostate cancer model. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**, 6205–6218 (2013).
264. Rode, I. & Boehm, T. Regenerative capacity of adult cortical thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 3463–3468 (2012).
265. Shah, D. K. & Zúñiga-Pflücker, J. C. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 4017–4023 (2014).
266. Yang, X. *et al.* Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res.* **16**, 995–1004 (2006).
267. Mauvais-Jarvis, F. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **22**, 24–33 (2011).
268. Eppig, J. T. *et al.* The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Res.* **43**, D726–736 (2015).
269. Tumbar, T. *et al.* Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. *Science* **303**, 359–363 (2004).
270. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, R106 (2010).
271. Borowsky, A. D. *et al.* Sphingosine-1-phosphate lyase expression in embryonic and adult murine tissues. *J. Lipid Res.* **53**, 1920–1931 (2012).
272. Wei, S.-C., Tsao, P.-N., Weng, M.-T., Cao, Z. & Wong, J.-M. Flt-1 in colorectal cancer cells is required for the tumor invasive effect of placental growth factor through a p38-MMP9 pathway. *J. Biomed. Sci.* **20**, 39 (2013).
273. Lin, M.-L., Park, J.-H., Nishidate, T., Nakamura, Y. & Katagiri, T. Involvement of maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) in mammary carcinogenesis through interaction with Bcl-G, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *Breast Cancer Res.* **9**, R17 (2007).
274. Klink, M. *et al.* The interaction of HspA1A with TLR2 and TLR4 in the response of neutrophils induced by ovarian cancer cells in vitro. *Cell Stress Chaperones* **17**, 661–674 (2012).
275. Huh, J.-I. *et al.* 2-Methoxyestradiol Induces Mammary Gland Differentiation through Amphiregulin-Epithelial Growth Factor Receptor-Mediated Signaling: Molecular Distinctions from the Mammary Gland of Pregnant Mice. *Endocrinology* **148**, 1266–1277 (2007).
276. Collard, J.-F., Mertens, B. & Hinsenkamp, M. In vitro study of the effects of ELF electric fields on gene expression in human epidermal cells. *Bioelectromagnetics* **32**, 28–36 (2011).
277. Bonauer, A. & Dimmeler, S. The microRNA-17-92 cluster: still a miRacle? *Cell Cycle Georget. Tex* **8**, 3866–3873 (2009).

278. Corbeaux, T. *et al.* Thymopoiesis in mice depends on a Foxn1-positive thymic epithelial cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16613–16618 (2010).
279. Nowell, C. S. *et al.* Foxn1 Regulates Lineage Progression in Cortical and Medullary Thymic Epithelial Cells But Is Dispensable for Medullary Sublineage Divergence. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
280. Anderson, G. & Takahama, Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol.* **33**, 256–263 (2012).
281. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–391 (2014).
282. St-Pierre, C. *et al.* Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci. Rep.* **3**, (2013).
283. Sansom, S. N. *et al.* Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res.* **24**, 1918–1931 (2014).
284. Pinto, S. *et al.* Overlapping gene coexpression patterns in human medullary thymic epithelial cells generate self-antigen diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E3497–E3505 (2013).
285. Guerau-de-Arellano, M., Martinic, M., Benoist, C. & Mathis, D. Neonatal tolerance revisited: a perinatal window for Aire control of autoimmunity. *J. Exp. Med.* **206**, 1245–1252 (2009).
286. Dertschnig, S., Hauri-Hohl, M. M., Vollmer, M., Holländer, G. A. & Krenger, W. Impaired thymic expression of tissue-restricted antigens licenses the de novo generation of autoreactive CD4⁺ T cells in acute GVHD. *Blood* **125**, 2720–2723 (2015).
287. Ferrara, J. L. M., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet Lond. Engl.* **373**, 1550–1561 (2009).
288. Vincent, K., Roy, D.-C. & Perreault, C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood* **118**, 2951–2959 (2011).
289. Jain, R. & Gray, D. H. D. Isolation of thymic epithelial cells and analysis by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.* **107**, 3.26.1-15 (2014).
290. Blais, M.-È. *et al.* Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood* **103**, 3102–3110 (2004).
291. Krueger, A., Ziętara, N. & Łyszkiewicz, M. T Cell Development by the Numbers. *Trends Immunol.* **38**, 128–139 (2017).
292. Breed, E. R., Lee, S. T. & Hogquist, K. A. Directing T cell fate: How thymic antigen presenting cells coordinate thymocyte selection. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2017). doi:10.1016/j.semcdb.2017.07.045
293. Chidgey, A., Dudakov, J., Seach, N. & Boyd, R. Impact of niche aging on thymic regeneration and immune reconstitution. *Semin. Immunol.* **19**, 331–340 (2007).

294. Chung, B., Barbara-Burnham, L., Barsky, L. & Weinberg, K. Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. *Blood* **98**, 1601–1606 (2001).
295. Weissman, I. L. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell* **100**, 157–168 (2000).
296. Fukada, S. *et al.* Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells in Adult Skeletal Muscle. *Stem Cells* **25**, 2448–2459 (2007).
297. Snippet, H. J. & Clevers, H. Tracking adult stem cells. *EMBO Rep.* **12**, 113–122 (2011).
298. Foudi, A. *et al.* Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **27**, 84–90 (2009).
299. Fuchs, E. & Horsley, V. Ferreting out stem cells from their niches. *Nat. Cell Biol.* **13**, 513–518 (2011).
300. Chakkalakal, J. V., Jones, K. M., Basson, M. A. & Brack, A. S. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* **490**, 355–360 (2012).
301. Rigamonti, A., Brennand, K., Lau, F. & Cowan, C. A. Rapid Cellular Turnover in Adipose Tissue. *PLoS ONE* **6**, e17637 (2011).
302. Dumont-Lagacé, M., St-Pierre, C. & Perreault, C. Sex hormones have pervasive effects on thymic epithelial cells. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
303. Ohigashi, I. *et al.* Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from β 5t-expressing progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9885–9890 (2013).
304. Waghmare, S. K. *et al.* Quantitative proliferation dynamics and random chromosome segregation of hair follicle stem cells. *EMBO J.* **27**, 1309–1320 (2008).
305. Popa, I. *et al.* Regeneration of the adult thymus is preceded by the expansion of K5+K8+ epithelial cell progenitors and by increased expression of Trp63, cMyc and Tcf3 transcription factors in the thymic stroma. *Int. Immunol.* **19**, 1249–1260 (2007).
306. Pawlik, T. M. & Keyomarsi, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol.* **59**, 928–942 (2004).
307. Kao, G. D., McKenna, W. G. & Yen, T. J. Detection of repair activity during the DNA damage-induced G2 delay in human cancer cells. *Oncogene* **20**, 3486–3496 (2001).
308. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13 (2009).
309. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
310. Rodriguez-Galán, M. C., Bream, J. H., Farr, A. & Young, H. A. Synergistic effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 2796–2804 (2005).

311. Snyder, H. L. *et al.* Two novel routes of transporter associated with antigen processing (TAP)-independent major histocompatibility complex class I antigen processing. *J. Exp. Med.* **186**, 1087–1098 (1997).
312. Tschoeke, S. K. *et al.* Endogenous IL-10 Regulates Sepsis-induced Thymic Apoptosis and Improves Survival in Septic IL-10 Null Mice. *Scand. J. Immunol.* **68**, 565–571 (2008).
313. Chantry, D. *et al.* Macrophage-derived chemokine is localized to thymic medullary epithelial cells and is a chemoattractant for CD3(+), CD4(+), CD8(low) thymocytes. *Blood* **94**, 1890–1898 (1999).
314. Fu, W. X. *et al.* Differential chemotactic potential of mouse platelet basic protein for thymocyte subsets. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **61**, 1935–1945 (2004).
315. Doyonnas, R. *et al.* Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* **105**, 4170–4178 (2005).
316. Lee, R. H. *et al.* The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood* **113**, 816–826 (2009).
317. Moscoso, I. *et al.* Podocalyxin-like protein 1 is a relevant marker for human c-kit(pos) cardiac stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **10**, 580–590 (2016).
318. Soh, B. S. *et al.* Pleiotrophin Enhances Clonal Growth and Long-Term Expansion of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **25**, 3029–3037 (2007).
319. Patenaude, J. & Perreault, C. Thymic Mesenchymal Cells Have a Distinct Transcriptomic Profile. *J. Immunol.* **196**, 4760–4770 (2016).
320. Tamura, H., Fukada, M., Fujikawa, A. & Noda, M. Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is involved in hippocampus-dependent memory formation through dephosphorylation at Y1105 on p190 RhoGAP. *Neurosci. Lett.* **399**, 33–38 (2006).
321. Boulais, P. E. & Frenette, P. S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* **125**, 2621–2629 (2015).
322. Xiao, Y. *et al.* Perivascular Hair Follicle Stem Cells Associate with a Venule Annulus. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2324–2331 (2013).
323. Yoshida, S., Sukeno, M. & Nabeshima, Y.-I. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* **317**, 1722–1726 (2007).
324. Ikushima, Y. M. *et al.* Enhanced Angpt1/Tie2 signaling affects the differentiation and long-term repopulation ability of hematopoietic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 20–25 (2013).
325. Sun, J. *et al.* Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature* **514**, 322–327 (2014).
326. Smith, M. J. *et al.* T cell progenitor therapy–facilitated thymopoiesis depends upon thymic input and continued thymic microenvironment interaction. *JCI Insight* **2**,
327. Tian, H. *et al.* A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* **478**, 255–259 (2011).

328. Nowell, C. S. & Radtke, F. Corneal epithelial stem cells and their niche at a glance. *J Cell Sci* **130**, 1021–1025 (2017).
329. Majo, F., Rochat, A., Nicolas, M., Jaoudé, G. A. & Barrandon, Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* **456**, 250–254 (2008).
330. Mendelson, A. & Frenette, P. S. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* **20**, 833–846 (2014).
331. Seach, N., Wong, K., Hammett, M., Boyd, R. L. & Chidgey, A. P. Purified enzymes improve isolation and characterization of the adult thymic epithelium. *J. Immunol. Methods* **385**, 23–34 (2012).
332. Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N. & Šmuc, T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLOS ONE* **6**, e21800 (2011).
333. Clarke, A. G. & Kendall, M. D. The thymus in pregnancy: the interplay of neural, endocrine and immune influences. *Immunol. Today* **15**, 545–551 (1994).
334. Laan, M., Haljasorg, U., Kisand, K., Salumets, A. & Peterson, P. Pregnancy-induced thymic involution is associated with suppression of chemokines essential for T-lymphoid progenitor homing. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2008–2017 (2016).
335. Peschon, J. J. *et al.* Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**, 1955–1960 (1994).
336. Rodewald, H.-R., Kretzschmar, K., Swat, W. & Takeda, S. Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo. *Immunity* **3**, 313–319 (1995).
337. Hozumi, K. *et al.* Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J. Exp. Med.* **205**, 2507–2513 (2008).
338. Rijhsinghani, A. G., Bhatia, S. K., Tygrett, L. T. & Waldschmidt, T. J. Effect of Pregnancy on Thymic T Cell Development. *Am. J. Reprod. Immunol.* **35**, 523–528 (1996).
339. Gerondakis, S. & Siebenlist, U. Roles of the NF- κ B Pathway in Lymphocyte Development and Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000182 (2010).
340. Lopes, N., Sergé, A., Ferrier, P. & Irla, M. Thymic Crosstalk Coordinates Medulla Organization and T-Cell Tolerance Induction. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
341. Martins, V. C., Boehm, T. & Bleul, C. C. Lt β r Signaling Does Not Regulate Aire-Dependent Transcripts in Medullary Thymic Epithelial Cells. *J. Immunol.* **181**, 400–407 (2008).
342. Seach, N. *et al.* The Lymphotoxin Pathway Regulates Aire-Independent Expression of Ectopic Genes and Chemokines in Thymic Stromal Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 5384–5392 (2008).
343. Takahama, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 127–135 (2006).
344. Petrie, H. T. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Zoned Out: Functional Mapping of Stromal Signaling Microenvironments in the Thymus. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 649–679 (2007).

345. Bunting, M. D., Comerford, I. & McColl, S. R. Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 185–196 (2011).
346. Alves, N. L. *et al.* Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1512–1517 (2009).
347. DiSanto, J. P., Müller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A. & Rajewsky, K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 377–381 (1995).
348. Nakagawa, T. *et al.* Cathepsin L: Critical Role in Ii Degradation and CD4 T Cell Selection in the Thymus. *Science* **280**, 450–453 (1998).
349. Wang, X., Laan, M., Kisand, K., Scott, H. S. & Peterson, P. Post-Aire maturation of thymic medullary epithelial cells involves selective expression of keratinocyte-specific autoantigens. *Front. Immunol. Toler.* **3**, 19 (2012).
350. Kozai, M. *et al.* Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. *J. Exp. Med.* jem.20161864 (2017). doi:10.1084/jem.20161864
351. Cartharius, K. *et al.* MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**, 2933–2942 (2005).
352. Pan, Y. F. *et al.* Regulation of Estrogen Receptor-mediated Long Range Transcription via Evolutionarily Conserved Distal Response Elements. *J. Biol. Chem.* **283**, 32977–32988 (2008).
353. Rubel, C. A. *et al.* Research Resource: Genome-Wide Profiling of Progesterone Receptor Binding in the Mouse Uterus. *Mol. Endocrinol.* **26**, 1428–1442 (2012).
354. Knoedler, J. R. & Denver, R. J. Krüppel-like factors are effectors of nuclear receptor signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* **203**, 49–59 (2014).
355. Ortman, C. L., Dittmar, K. A., Witte, P. L. & Le, P. T. Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int. Immunol.* **14**, 813–822 (2002).
356. Ghaleb, A. M. & Yang, V. W. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene* **611**, 27–37 (2017).
357. Siu, M.-K. *et al.* KLF4 functions as an activator of the androgen receptor through reciprocal feedback. *Oncogenesis* **5**, e282 (2016).
358. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **30**, 2114–2120 (2014).
359. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **29**, 15–21 (2013).
360. Li, B. & Dewey, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323 (2011).
361. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).

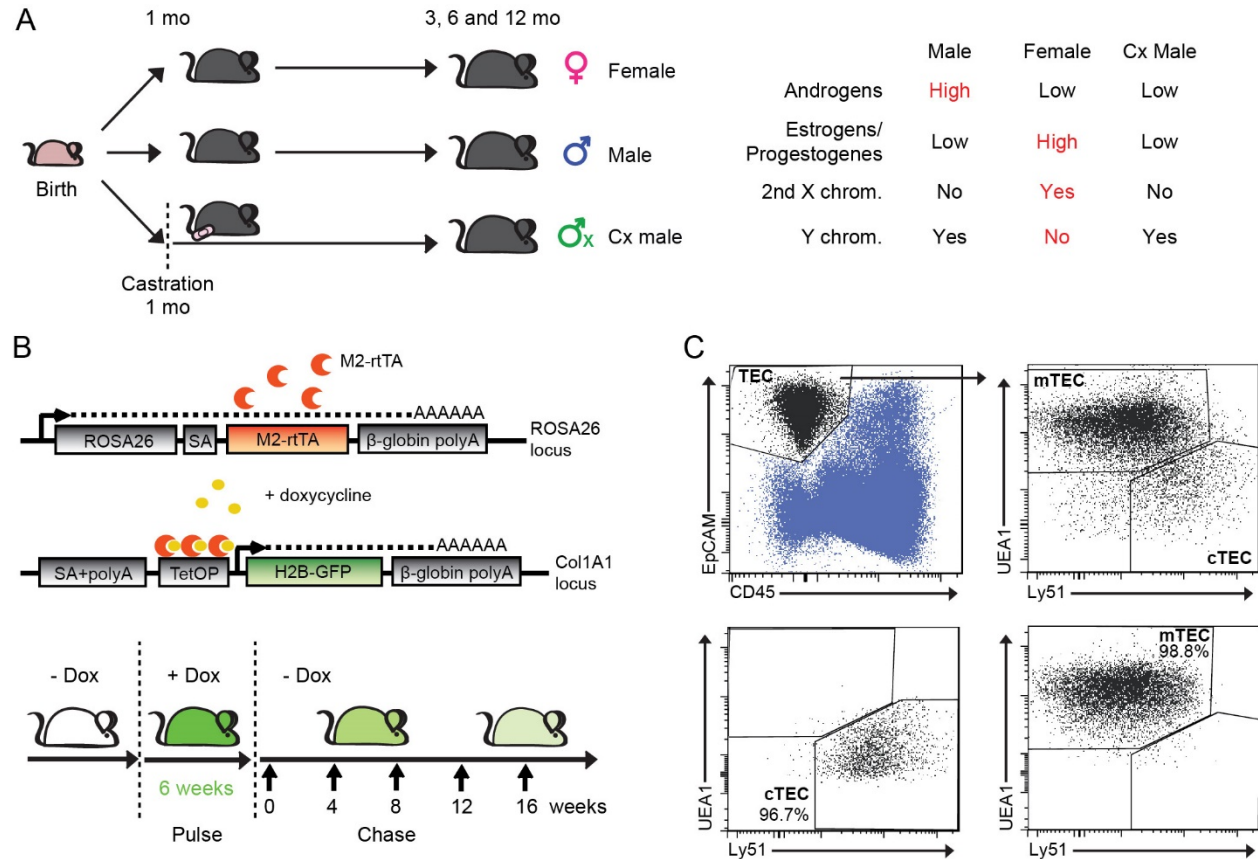
362. Zhang, W. *et al.* The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J. Biol. Chem.* **275**, 18391–18398 (2000).
363. Chen, X. *et al.* Krüppel-like Factor 4 (Gut-enriched Krüppel-like Factor) Inhibits Cell Proliferation by Blocking G1/S Progression of the Cell Cycle. *J. Biol. Chem.* **276**, 30423–30428 (2001).
364. Dang, D. T. *et al.* Overexpression of Krüppel-like factor 4 in the human colon cancer cell line RKO leads to reduced tumorigenicity. *Oncogene* **22**, 3424–3430 (2003).
365. Jiang, J. *et al.* A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **10**, 353–360 (2008).
366. Yoon, H. S., Chen, X. & Yang, V. W. Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **278**, 2101–2105 (2003).
367. Li, J. *et al.* Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis. *Carcinogenesis* **33**, 1239–1246 (2012).
368. Segre, J. A., Bauer, C. & Fuchs, E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat. Genet.* **22**, 356–360 (1999).
369. Jaubert, J., Cheng, J. & Segre, J. A. Ectopic expression of kruppel like factor 4 (Klf4) accelerates formation of the epidermal permeability barrier. *Dev. Camb. Engl.* **130**, 2767–2777 (2003).
370. Patel, S., Xi, Z. F., Seo, E. Y., McGaughey, D. & Segre, J. A. Klf4 and corticosteroids activate an overlapping set of transcriptional targets to accelerate in utero epidermal barrier acquisition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18668–18673 (2006).
371. McConnell, B. B. & Yang, V. W. Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol. Rev.* **90**, 1337–1381 (2010).
372. Ghaleb, A. M., McConnell, B. B., Kaestner, K. H. & Yang, V. W. Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Krüppel-like factor 4 gene. *Dev. Biol.* **349**, 310–320 (2011).
373. Akaogi, K. *et al.* KLF4 suppresses estrogen-dependent breast cancer growth by inhibiting the transcriptional activity of ERalpha. *Oncogene* **28**, 2894–2902 (2009).

Annexes

6.1 Annexe I

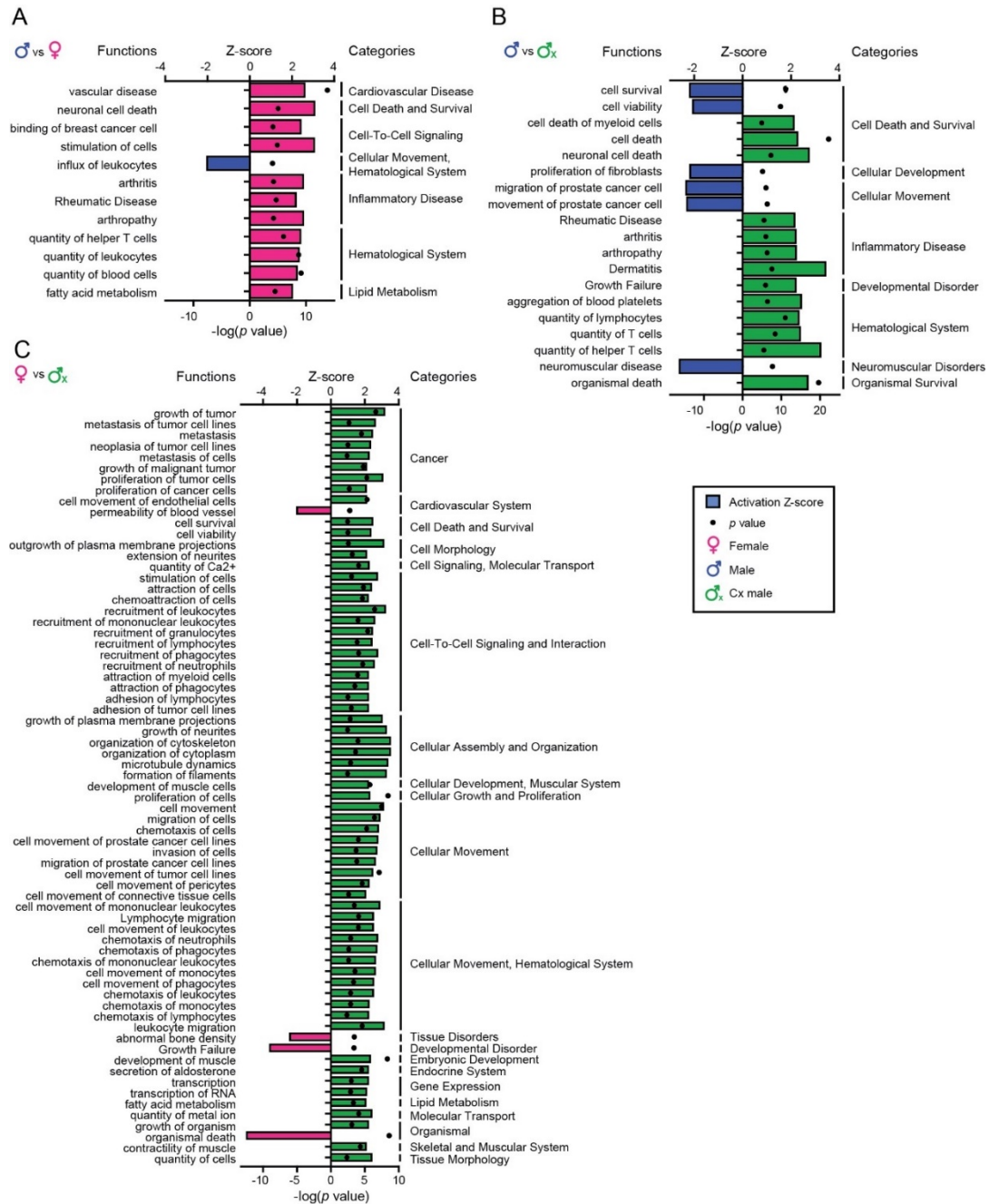
Informations supplémentaires reliées à l'article "Sex hormones have pervasive effects on thymic epithelial cells", Dumont-Lagacé M, St-Pierre C and Perreault C, *Scientific Reports*, 2015, **vol 5**, 12895. Comprend 3 figures.

6.1.1 Supplemental figures



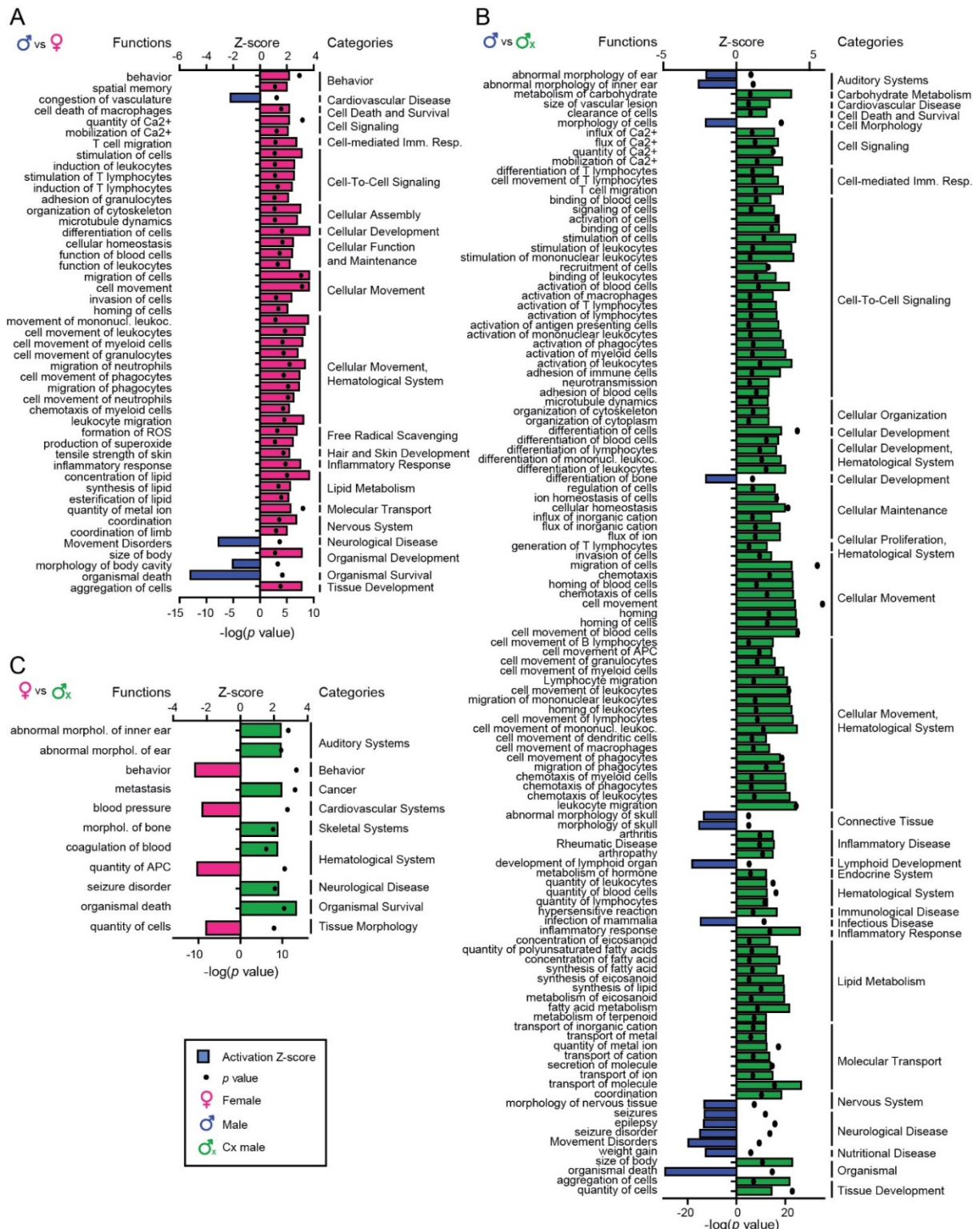
Supplementary Figure S1.1 | Experimental design for phenotypic and transcriptomic analyses of male, female and Cx male TECs

(A) Castration was performed at 1 month of age, and mice were analysed at 1, 3, 6 and 12 months of age. The table on the right displays the physiological differences that can directly account for differences between the experimental groups. Features unique to a group are in red, whereas features that can be found in two groups are in black. (B) The H2B-GFP:rtTA mouse model. Administration of doxycycline activates the M2-rtTA transactivator and allows the expression of H2B-GFP during the pulse period. The H2B-GFP will be incorporated in the nucleus during cell division in the pulse period (6 weeks) and segregates equally in the daughter cells during cell division during the chase period (16 weeks). (C) Gating strategy to identify and sort cTECs and mTECs (TECs: EpCAM+CD45⁻, cTECs: Ly51+UEA1⁻ and mTECs: Ly51-UEA1⁺). Below: post-sort analysis of sorted cTECs and mTECs. The figure was drawn by Maude Dumont-Lagacé.



Supplementary Figure S1.2 | Differentially activated functions in cTECs according to IPA analysis

(A) Analysis of DEGs between males and females, (B) between males and Cx males and (C) between females and Cx males. Activation Z-score is depicted in bars, whereas p values are depicted with black dots. The color of bars shows in which group a given process is activated (e.g., blue = males). All functions represented are significant ($p < 0.05$).



Supplementary Figure S1.3 | Differentially activated functions in mTECs according to IPA analysis

(A) Analysis of DEGs between males and females, (B) between males and Cx males and (C) between females and Cx males. Activation Z-score is depicted in bars, whereas p values are depicted with black dots. The color of bars shows in which group a given process is activated (e.g., blue = males). All functions represented are significant ($p < 0.05$).

6.2 Annexe II

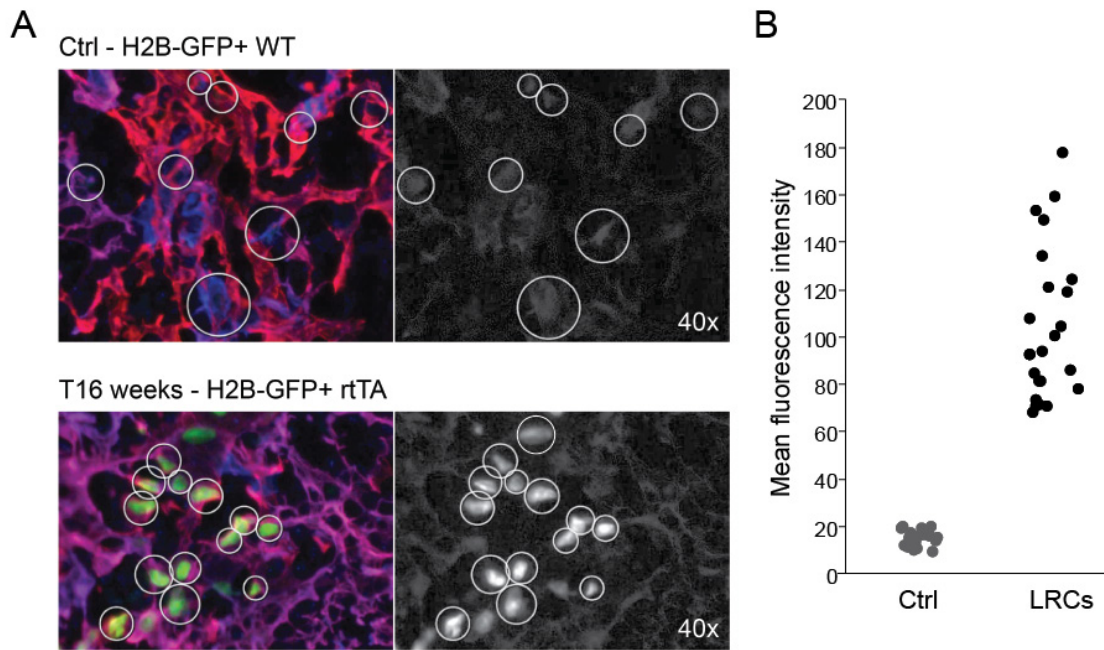
Informations supplémentaires reliées à l'article "Detection of Quiescent Radioresistant Epithelial Progenitors in the Adult Thymus", Dumont-Lagacé M, Gerbe H, Daouda T, Laverdure JP, Brochu S, Lemieux S, Gagnon E and Perreault C, *Frontiers in Immunology* 2017, vol 8, 1717. Comprend un tableau contenant la liste des anticorps utilisés, 4 Figures et une Table.

6.2.1 Supplementary experimental procedures

Supplementary Table S2.1 | Antibodies used for immunofluorescence microscopy (IFM) and flow cytometry (FC) analyses

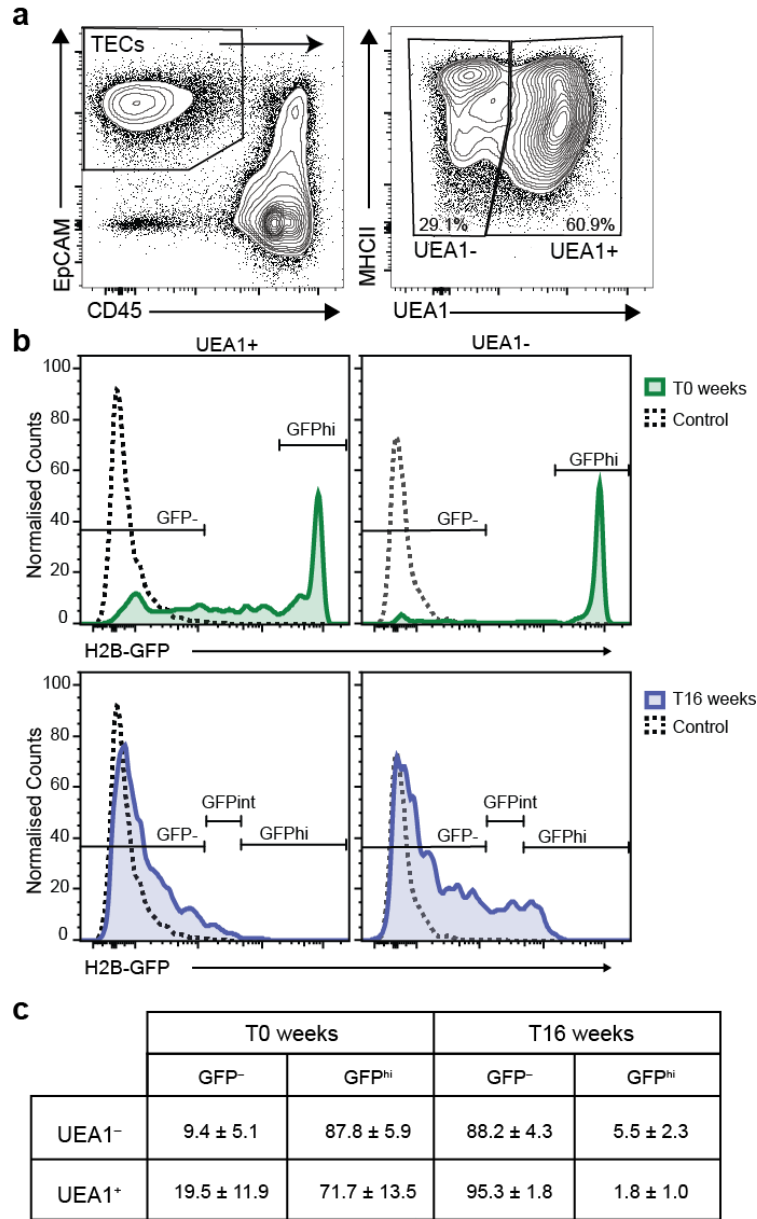
Antigen	Clone	Supplier	Staining
EpCAM - APC-Cy7	G8.8	BioLegend	FC
CD45 - PE-Cy5	30-F11	BD Biosciences	FC
CD45 - Alexa Fluor 700	30-F11	BD Biosciences	FC
UEA1 - biotinylated	Purified lectin	Vector Laboratories	FC
I-A/I-E - Alexa Fluor 700	M5/114 15.2	BioLegend	FC
I-A/I-E - APC	M5/114 15.2	BioLegend	FC
Ly-6A/E (Sca1) - PerCP-Cy5.5	D7	eBioscience	FC
CD49f (α 6-integrin) - APC	GoH3	eBioscience	FC
CD49f (α 6-integrin) - PE-Cy7	GoH3	eBioscience	FC
CD24 - PE	M1/69	BD Biosciences	FC
CD24 - PE-Cy7	M1/69	BD Biosciences	FC
CD24 - Alexa Fluor 700	M1/69	BD Biosciences	FC
BrdU flow kit - APC	Kit	BD Biosciences	FC
Cytokeratin 8 - purified	TROMA-I	DSHB Iowa	IFM
Keratin 5 polyclonal- purified	Poly19055	BioLegend	IFM
Donkey anti-rabbit IgG – DyLight 405	Poly4054	BioLegend	IFM
Goat anti-rat IgG – DyLight 594	Poly4064	BioLegend	IFM
Streptavidin – PE-Cy7	-	BD Biosciences	FC
Streptavidin – PE-Texas Red	-	BD Biosciences	FC
Plet1 – Purified	ID4	EMD Millipore	FC
Ly51 – Alexa Fluor 647	6C3	Biolegend	FC

6.2.2 Supplementary Figures



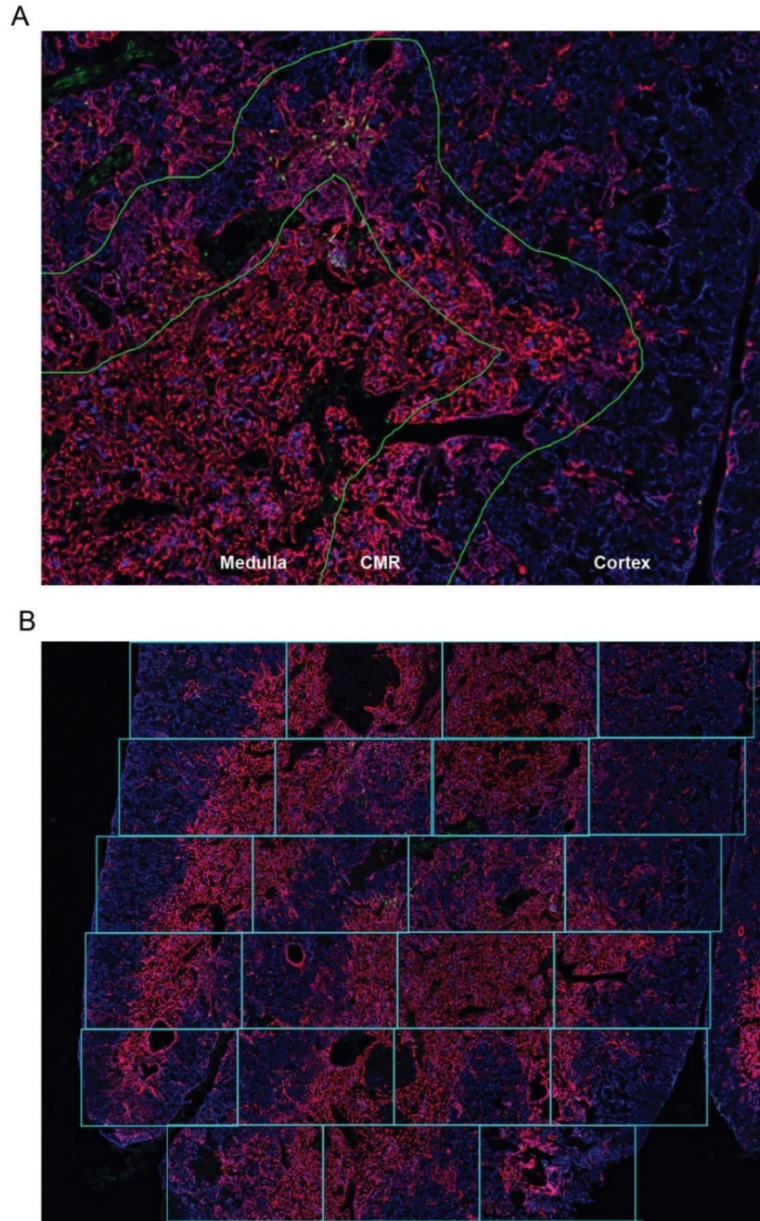
Supplementary Figure S2.1 | Identification of LRCs on thymic slices

(A) Representative images of thymic slices for negative control (upper panels) and T16 weeks thymic slices (lower panels). Staining for K5 (red), K8 (blue) and H2B-GFP (green) are shown on left panels and H2B-GFP fluorescence only is shown in the right panels. Circles indicate cells for which mean fluorescence intensity was measured in the negative control (i.e. cells with the highest fluorescence intensity) and examples of LRCs in the T16 weeks samples. LRCs were identified using a threshold of fluorescence four times greater than the average fluorescence intensity of the negative control. (B) Mean fluorescence intensity in negative control and for LRCs in T16 weeks.



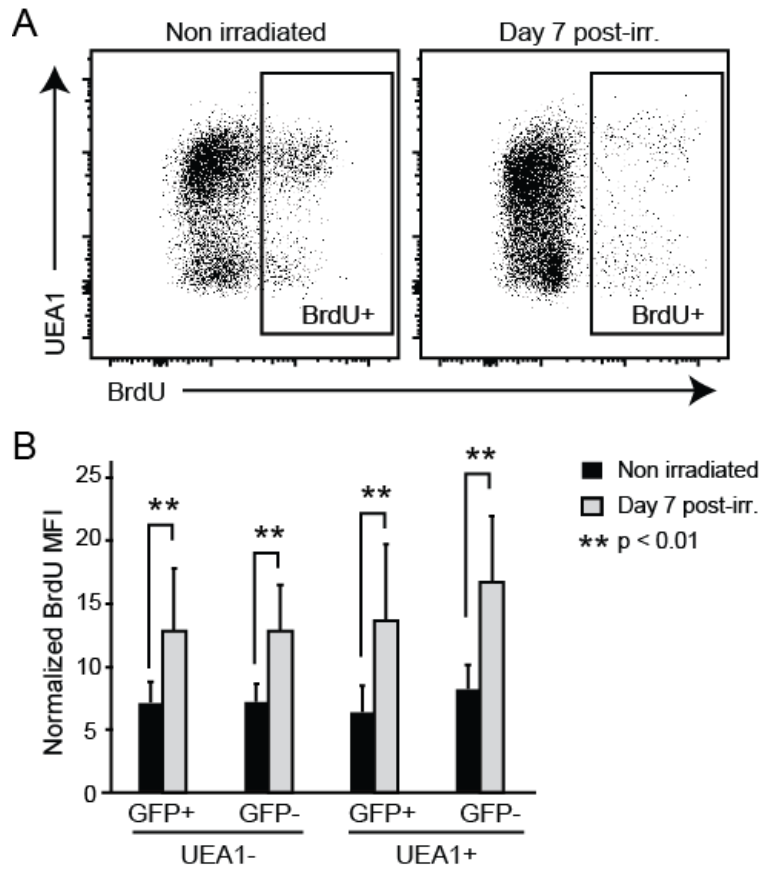
Supplementary Figure S2.2 | Gating strategy for GFP⁻, GFP^{int} and GFP^{hi} TECs

(A) TECs (EpCAM⁺ CD45⁻) were separated into UEA1⁺ and UEA1⁻ subsets. (B) The H2B-GFP fluorescence reached a maximum at the end of the pulse period (upper panels, shown in green, T0 weeks) and decreased progressively during the chase period (lower panels, shown in blue, T16 weeks). The negative control (dotted line, H2B-GFP⁺ WT) was used to define the limit between GFP⁻ and GFP^{int}. The GFP^{hi} threshold was 4x above that for GFP^{int}. (C) Percentages of GFP⁻ and GFP^{hi} TECs in the UEA1⁺ and UEA1⁻ subsets at T0 and T16 weeks.



Supplementary Figure S2.3 | Histological analysis of GFP⁺ TECs

(A) Representative image of the cortico-medullary region, delimited in green (related to Figure 2.1, p.42). (B) Representative image of a thymic slice separated into sections. Each thymic slice was separated in 40 to 50 non-overlapping sections and a total of 4 slices from 2 mice were analyzed (related to Figure 2.2, p.45).



Supplementary Figure S2.4 | BrdU incorporation in proliferating TECs is higher on day 7 post-irradiation than in non-irradiated controls

(A) Representative staining for UEA1 and BrdU in TECs from non-irradiated mice and at day 7 post-irradiation. (B) MFI of BrdU⁺ TECs normalized on the average of UEA1⁻ or UEA1⁺ population (n = 10 to 11, representative of 3 experiments).

6.2.3 Supplementary Table

Table Supplémentaire S2.2 | Comparison of the cell surface phenotype of UEA1⁻ LRCs with that of TEPCs identified in other reports

	EpCAM	UEA1	MHCII	Sca1	CD49f	Ly51	Plet1	CD24
Wong et al (2014)	+	–	low	high	high	<i>na</i>	–	<i>na</i>
Ucar et al (2014)	–	<i>na</i>	<i>na</i>	+	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>na</i>	–
Ulyanchenko et al (2016)	+	–	high	<i>na</i>	<i>na</i>	+	+	<i>na</i>
UEA1 ⁻ LRCs	+	–	low	high	high	low/high	–	–/low

Features shared with UEA1⁻ LRCs are indicated in bold green.

6.3 Annexe III

6.3.1 Tables supplémentaires

Table Supplémentaire S3.1 | Top 10 des familles de sites de liaison dans la région promotrice de *Foxn1*

<i>Familles de matrice</i>	<i>Total de sites de liaison</i>	<i>Valeur p</i>
V\$KLFS	262	0.0291078
V\$SORY	208	0.00980099
V\$ETSF	187	0.00690237
V\$ZF02	178	0.142376
V\$FKHD	157	0.0360173
V\$HOMF	139	0.0237656
V\$RXRF	132	0.0126642
V\$EGRF	129	0.143309
V\$STAT	127	0.053016
V\$NR2F	116	0.0164269

Table Supplémentaire S3.2 | Réactifs utilisés pour les analyses en cytométrie en flux

Réactif	# Catalogue	Clone	Fournisseur	# Lot
Collagénase D	11088866001	-	Sigma	15731423
DNase I	D25-1G	-	Sigma	SLBF7798V
Papaïne	LS003119	-	Worthington-Biochem	37J17641
LS Columns	130-042-401	-	Miltenyi Biotec	5180129007
CD326 (EpCAM) Microbeads mouse	130-105-958	-	Miltenyi Biotec	5171027038
EpCAM - APC-Cy7	118218	G8.8	BioLegend	B244598
CD45 - PE-Cy5	553082	30-F11	BD Biosciences	ND
UEA1 – biotinylated	B-1065	-	Vector Laboratories	0331
I-A/I-E - Alexa Fluor 700	107622	M5/114.15.2	BioLegend	B217859
I-A/I-E – APC	107614	M5/114.15.2	BioLegend	B191785
Ly51 – FITC	553160	6C3	Biolegend	83063
Streptavidin – PE-Cy7	557598	-	BD Biosciences	5126578
CD4 – Alexa Fluor 700	557956	RM4-5	BD Biosciences	7047620
CD4 – BV421	100443	GK1.5	Biolegend	B223832
CD8a – FITC	553031	53-6.7	BD Biosciences	05932
CD11c – PE-Cy7	558079	HL3	BD Biosciences	7005642
CD25 – APC-Cy7	557658	PC61	BD Biosciences	35781
CD44 – APC	559250	IM7	BD Biosciences	50592
PE Mouse anti-Human Ki67 set	556027	-	BD Biosciences	5113744
Factor staining buffer set	00-5523-00	-	Invitrogen	1957127
Propidium iodine	51-66211E	-	BD Biosciences	6155503